UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN REAKTIVTÄT DES 3'-ENDES VON $tRNA^{Phe}$ UND $tRNA^{Val}$ AUS HEFE MITTELS OXIDATION DURCH MONOPERPHTHALSÄURE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Rüdiger Solfert
aus
Gleiwitz

Göttingen 1974

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMISCHEN REAKTIVTÄT DES 3'-ENDES VON $tRNA^{Phe}$ UND $tRNA^{Val}$ AUS HEFE MITTELS OXIDATION DURCH MONOPERPHTHALSÄURE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Rüdiger Solfert
aus
Gleiwitz

Göttingen 1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. Rensing

Korreferent: Prof. Dr. Birukow

eingereicht am: 27. 5. 1974

mündliche Prüfung am: 3. 7. 1974

Meinem verehrten Lehrer, Professor Dr. Friedrich Cramer, danke ich für das mir erwiesene Wohlwollen und für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. L. Rensing danke ich für sein stets förderndes Interesse an der vorliegenden Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. von der Haar für die Einführung in das Gebiet der Nucleinsäurechemie. Herrn Dr. M. Sprinzl und Herrn Dr. H. Sternbach danke ich für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG.....1

Problemstellung.....2

II. ERGEBNISSE.....3

1. Isolierung des Nonanucleotids A-A-A-U-C-A-C-C-A.....3

2. Synthese des Pentanucleotides G-A-U-U-U.....4

3. Komplexbildung von A-A-A-U-C-A-C-C-A und G-A-U-U-U.....8

4. N-Oxidation.....1o

4a) N-Oxidation des Nonanucleotids A-A-A-U-C-A-C-C-A.....11

4b) N-Oxidation eines Komplexes aus A-A-A-U-C-A-C-C-A und G-A-U-U-U.....14

4c) N-Oxidation von tRNA.....15

4d) Kinetik der N-Oxidation bei $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} und $tRNA^{Phe}$-C-C_{75}.....19

4e) Partielle N-Oxidation von $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76}.....23

4f) Partielle N-Oxidation des Pentanucleotids 3' C-A-C-C-A..26

5. Biologische Aktivität partiell N-oxidierter $tRNA^{Phe}$.....28

III. DISKUSSION.....3o

IV. ZUSAMMENFASSUNG.....37

V. EXPERIMENTELLER TEIL.....38

Seite

1. Materialien....38

2. Allgemeine Methoden....39

2a) Schmelzkurven der Oligonucleotide....39

2b) N-Oxidation der Oligonucleotide....4o

2c) N-Oxidation von tRNA....4o

2d) Monoperphthalsäureabtrennung....41

2e) Entsalzung der Oligonucleotide....41

2f) T_1-Ribonucleasespaltung von tRNA....41

2g) Säulenchromatographische Trennung der Oligonucleotide....42

2h) Sequenzanalyse der Oligonucleotide....42

2h1) Hydrolyse der Oligonucleotide....42

2h2) Analyse der Nucleoside....43

2i) Aminoacylierung....45

3. Spezielle Methoden....46

3a) Präparation [^{14}C]-markierter $tRNA^{Val}$-C-C-A_{76}....46

3b) Präparation [^{3}H]-markierter $tRNA^{Phe}$-C-C-A....47

3c) Präparation [^{14}C]-markierter $tRNA^{Phe}$-C-C_{75}....47

3d) Präparation des Pentanucleotids C-A-C-C-A....48

VI. LITERATURVERZEICHNIS....49

I. EINLEITUNG

Bei der Proteinbiosynthese nehmen die transfer-Ribonucleinsäuren eine zentrale Stellung ein. Sie führen die Aminosäuren aus dem Aminosäurepool der Zelle in den ribosomalen Apparat, wo die genetische Information der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt wird. Für das Verständnis dieser komplexen Abläufe ist die Kenntnis der tRNA-Struktur eine notwendige Voraussetzung[1]. Die Röntgenstrukturanalyse der $tRNA^{Phe}$ aus Hefe von Rich[2] kann daher als ein Meilenstein in der Nucleinsäureforsc ung bezeichnet werden. Diese Analyse vermittelt eine detaillierte Vorstellung von der Struktur dieser kleinsten biologisch aktiven Nucleinsäure. Viele Diskussionen über eine Zuordnung der strukturstabilisierenden basengepaarten Bereiche (stems) wurden damit eingeschränkt, doch die ursächlichen Phänomene der biologischen Aktivität bleiben weiterhin unverstanden und sind allein aus dieser Röntgenstrukturanalyse nicht erklärbar.

Ein erfolgversprechender Weg zur Lösung dieses Problems ist die gezielte chemische Modifikation der tRNA. Es konnte dadurch gezeigt werden, daß definierte Bereiche in der tRNA einer eindeutigen biologischen Funktion zuzuordnen sind. So ist z.B. erstens die Notwendigkeit der Sequenz T-Ψ-C-G für ribosomale tRNA-Wechselwirkung ebenso zu fordern[3] wie zweitens das -C-C-A Ende für die 2'-3'-Transacylierung der Aminosäure[4]. Drittens Definierte Trinucleotide in den Anticodon loops sind zudem zur Decodierung der linearen Information der mRNA via tRNAs in die globuläre Struktur der Proteine notwendig.

Für das Verständnis der schnellen spezifischen Wechselwirkungen wie zwischen tRNA und Synthetase ist u.a. eine genau definierte Struktur des 3'-Endes der tRNA erforderlich. Experimentelle Befunde von Littauer[6] über die erschwerte

Abspaltbarkeit des 5'-Phosphats aus der tRNA sowie die Arbeiten von Cramer et al.[7] über den sequenziellen Angriff von SVD am 3'-C-C-A Ende der tRNA sind mit der von Rich beschriebenen Struktur nur schwer zu erklären. Zudem konnte ein polymorphes Kristallisationsverhalten von $tRNA^{Phe}$ u.a. sowohl von Cramer et al.[8] wie auch von Rich et al.[9] gezeigt werden. Damit wurde Spekulationen Raum gegeben, daß tRNA möglicherweise in mehreren Konformationen[10] vorliegt, welche unter Umständen funktionale Bedeutung haben. Die Lösung von einer bislang statischen Betrachtungsweise zugunsten einer dynamischen wäre somit ein neuer Denkansatz.

Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß der basengepaarten Bereiche des -C-C-A stems der tRNA auf die Oxidierbarkeit ihres -C-C-A Endes mit Monoperphthalsäure im Vergleich zur Modellsubstanz eines -C-C-A Endes untersucht werden.

Als mögliches Modell soll der Komplex aus G-A-U-U-U und A-A-A-U-C-A-C-C-A gebildet werden, dessen Stabilität mittels Schmelzkurvenmessung festgestellt werden kann. Durch Oxidation mit Monoperphthalsäure wird untersucht, wie sich die Reaktivität des -C-C-A Endes der linearpolymeren Modellsubstanz zur Reaktivität des -C-C-A Endes der globulären tRNA verhält. In der 1973 publizierten Tertiärstruktur der $tRNA^{Phe}$ [2] ist der -C-C-A stem linear angeordnet, wie er in der Modellsubstanz zu erwarten ist. Daher ist zwischen Modellsubstanz und tRNA eine analoge Reaktivität des -C-C-A Endes zu vermuten.

II. ERGEBNISSE

1. Isolierung des Nonanucleotids A-A-A-U-C-A-C-C-A

$tRNA^{Val}$-C-C-A wurde mit 1.3 % $tRNA^{Val}$[^{14}C]-C-[^{14}C]-C-[^{14}C]-A_{76} versetzt und einer T_1-RNase-Spaltung unterworfen. Man erhielt unter anderem die Abspaltung des 3'-terminalen Nonanucleotids[11]. Zur Isolierung dieses Nucleotids wurden 140 OD des Reaktionsgemisches mit Harnstoff auf 7 M und mit HCl auf pH 7.5 eingestellt und auf eine DE-52-Zellulosesäule (1 x 60 cm) aufgezogen. Durch Chromatographie mittels eines linearen Gradienten bei pH 7.5 erhielt man das Nonanucleotid bei einer NaCl-Konzentration von 0.24 M. Die Ausbeute schwankte zwischen 5 - 10 % bezogen auf OD_{260} eingesetzte tRNA (Abb. 1).

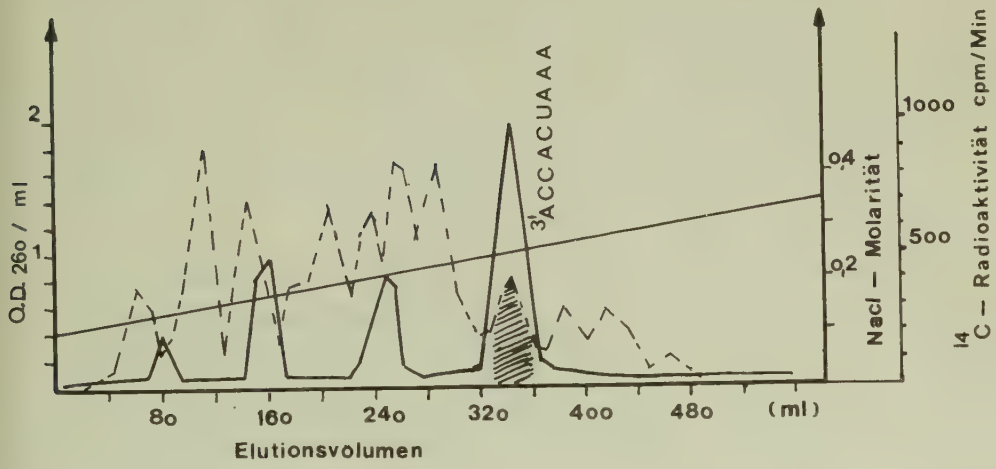


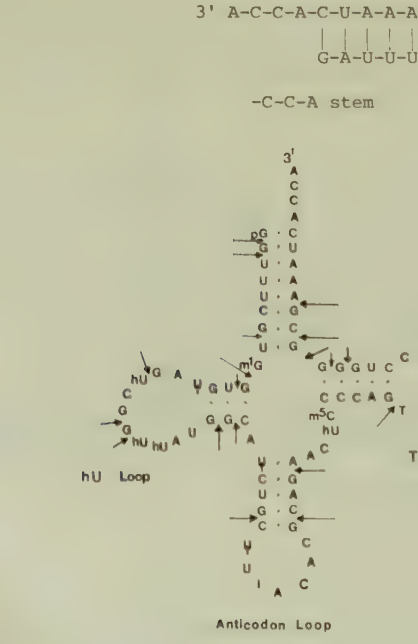
Abb. 1: Elutionsprofil der chromatographischen Trennung von Oligonucleotiden aus $tRNA^{Val}$-C-C-A_{76} nach T_1-Spaltung an DEAE-52 Zellulose (1 x 60 cm, Cl^--Form). Linearer Gradient: 2 x 300 ml von 0.1 - 0.35 M NaCl in 7 M Harnstoff pH 7.5. (——) OD_{260} nm/ml, (---) ^{14}C-Radioaktivität cpm/Min/50 µl.

2. Synthese des Pentanucleotids G-A-U-U-U

Auf der Suche nach Möglichkeiten, den biologisch relevanten Abschnitt des 3'-C-C-A stems besser kennenzulernen, bot sich als Modell der 3'-C-C-A stem der $tRNA^{Val}$ an. Anstoß zu diesen Überlegungen gaben folgende Befunde:

1. die Sequenz von $tRNA^{Val}$ ist bekannt[12].
2. $tRNA^{Val}$ ist die einzige bisher sequenzierte tRNA aus der sich das A-A-A-U-C-A-C-C-A als 3'-terminales Nucleotid gewinnen läßt.
3. Darüberhinaus läßt sich zum 3'-terminalen Nonanucleotid das komplementäre Pentanucleotid G-A-U-U-U synthetisieren.

Damit hat man das Modell eines 3'-terminalen -C-C-A stems einer tRNA in der Hand.



Sekundärstruktur von $tRNA^{Val}$. ◀— Angriff von T_1-Ribonuclease.

Die Synthese von homogenen Polynucleotiden wurde von Grunberg-Manago[13] untersucht. Mittels Polynucleotidphosphorylase wurden aus Nucleosiddiphosphaten Polynucleotide synthetisiert.

$$n\ UDP \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} (pU)_n + np_i$$

Klee und Fitt[14] konnten außerdem zeigen, daß durch kontrollierte Proteolyse der Polynucleotidphosphorylase sogenannte Primerabhängigkeit erhalten wird, so daß zum Starten der Synthese ein Dinucleosidmonophosphat oder ein Oligonucleotid längerer Kette benötigt wird. Dieses Verfahren ist daher geeignet, Oligonucleotide mit definierter Anfangssequenz zu synthetisieren.

Werden hierbei kurzkettige Oligonucleotide benötigt, so sind folgende Zusatzbedingungen einzuhalten:

1. Es sind hohe Salzkonzentrationen und lange Inkubationszeiten zu wählen, damit die phosphorolytische Aktivität des Enzyms zum Tragen kommt.
2. Das Verhältnis Primer : Substrat ist entsprechend der gewünschten Kettenlänge der Oligonucleotide zu bestimmen. Höhere Primer-Konzentrationen begünstigen die Bildung kürzerer Ketten.

Voruntersuchungen zur Synthese des G-A-U-U-U haben gezeigt, daß die hier verwendete Polynucleotidphosphorylase nahezu absolut G-A-Primer-abhängig war. Die de novo Synthese von $(pU)_n$ verlief mit vernachlässigbaren Ausbeuten, wie durch Nucleosidanalyse nachgewiesen werden konnte. Relativ hohe Ausbeuten an G-A-U-U-U ließen sich erhalten, wenn das Verhältnis Primer : Substrat mit 1 : 4 angesetzt wurde.

Für einen präparativen Ansatz wurden die von Schetters[15] angegebenen Bedingungen modifiziert und die synthetisierten Produkte durch Chromatographie bei

pH 7.5 getrennt (Abb. 2). Hierbei besteht eine lineare Abhängigkeit der Kettenlänge der eluierenden Produkte von der NaCl-Konzentration, wenn man Phosphat-Ladung pro Oligonucleotidkette über NaCl-Konzentration halblogarithmisch aufträgt (Abb. 3). Damit wurde die Isopleth-Regel von Cantoni[16] durch Chromatographie einer homologen Reihe von Oligonucleotiden direkt bestätigt.

Die Ausbeute an G-A-U-U-U betrug 18 % bezogen auf synthetisierte Oligonucleotide.

Für die Synthese des Pentanucleotids im präparativen Maßstab wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

UDP	4 ml (94 mg/ml)	800 µMol total
G-A	10 ml (12.24 mg/ml)	200 µMol total
1 M Tris-HCl pH 9	4.55 ml	150 mMol total
1 M $MgCl_2$	0.3 ml	10 mMol total
40 mM EDTA-K pH 7	0.3 ml	0.4 mMol total
5 M NaCl	3.6 ml	600 mMol total
H_2O	6.1 ml	
Polynucleotidphosphorlyase	1.2 ml	100 Einheiten/ml
Gesamtvolumen	30 ml	

Das angeführte Reaktionsgemisch wurde 72 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend über Biogel P-2 entsalzt, mit 1 M Tris-HCl pH 7.5 auf 0.01 M und mit Harnstoff auf 7 M eingestellt und auf eine DE-52 Zellulosesäule aufgezogen.

Die Trennung der synthetisierten Oligonucleotide erfolgte durch Chromatographie an DE-Zellulose bei pH 7.5. Das Pentanucleotid G-A-U-U-U wurde bei einer

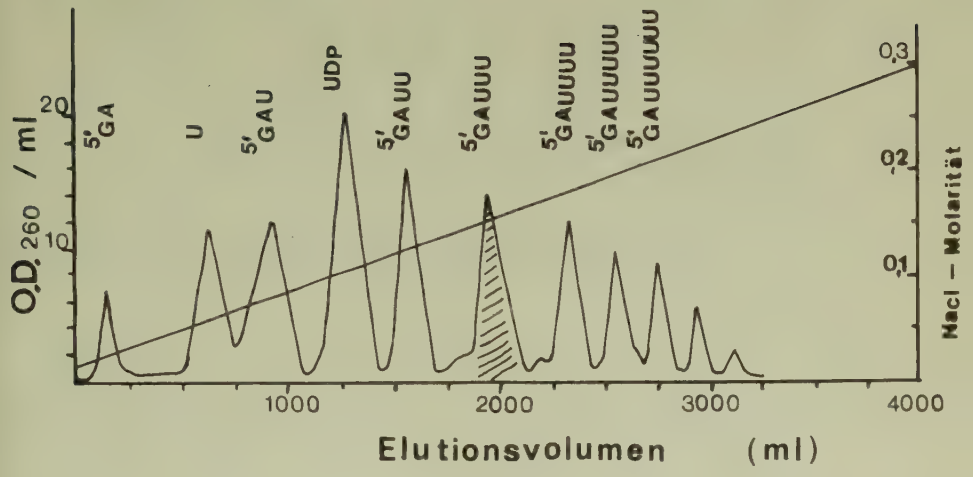


Abb. 2: Elutionsprofil der chromatographischen Trennung von Oligonucleotiden die mit Polynucleotidphosphorylase aus G-A und UDP synthetisiert wurden. Säulendimension: 2 x 100 cm. Linearer Gradient: 2 x 2L von 0.01 - 0.3 M NaCl in 7 M Harnstoff pH 7.5.

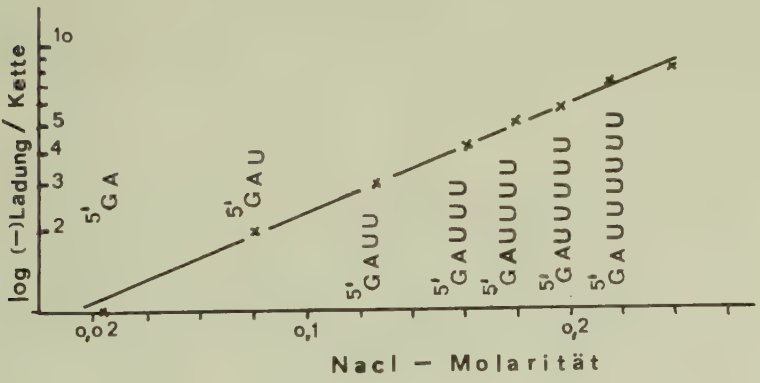


Abb. 3: Abhängigkeit der Anzahl negativer Ladungen (PO_4) pro Nucleotidkette einer homologen Reihe von Oligonucleotiden von der NaCl-Konzentration bei der Chromatographie an DE-52 Zellulose bei pH 7.5.

NaCl-Konzentration von 0.16 M eluiert. Die Identifizierung wurde durch Anal der synthetisierten Nucleotide ermöglicht.

3. Komplexbildung von A-A-A-U-C-A-C-C-A und G-A-U-U-U

Die Bedingungen für eine Komplexbildung kurzkettiger Oligonucleotide wurden bei Pörschke beschrieben[17] und auf das hier zu untersuchende System angewendet.

Nona- und Pentanucleotid wurde in einem molaren Verhältnis von 1 : 1 gemisc bei einer totalen Nucleotidkonzentration von 10^{-4} M. Der Nachweis einer Kom plexbildung bei derart hohen Konzentrationen wurde unterhalb des isosbesti schen Punktes bei einer Wellenlänge von 292 nm UV-spektroskopisch durchgeführt.

Die Schmelzkurvenmessungen der komplementären Nona- und Pentanucleotide zei im Vergleich zum reinen Nonanucleotid einen Komplex, der bei 25°C vollkomme kooperativ aufgeschmolzen ist. Ab 25°C findet nur ein kontinuierliches Aufschmelzen der gestackten Basen statt (Abb. 4).

Die Salzabhängigkeit der Komplexbildung wird in Abb. 3a und 3b gezeigt. Wäh rend mit 0.01 M Cacodylat-Puffer pH 6.9 ein totales Aufschmelzen des Komple bei 15°C erreicht wurde, kann dieser Zustand mit 0.24 M Phosphatpuffer pH 7 erst bei 25°C erreicht werden. Der T_m-Wert wurde in hohen Salzkonzentratio mit 4.1°C bestimmt. In niederen Salzkonzentrationen läßt sich kein T_m-Wert bestimmen.

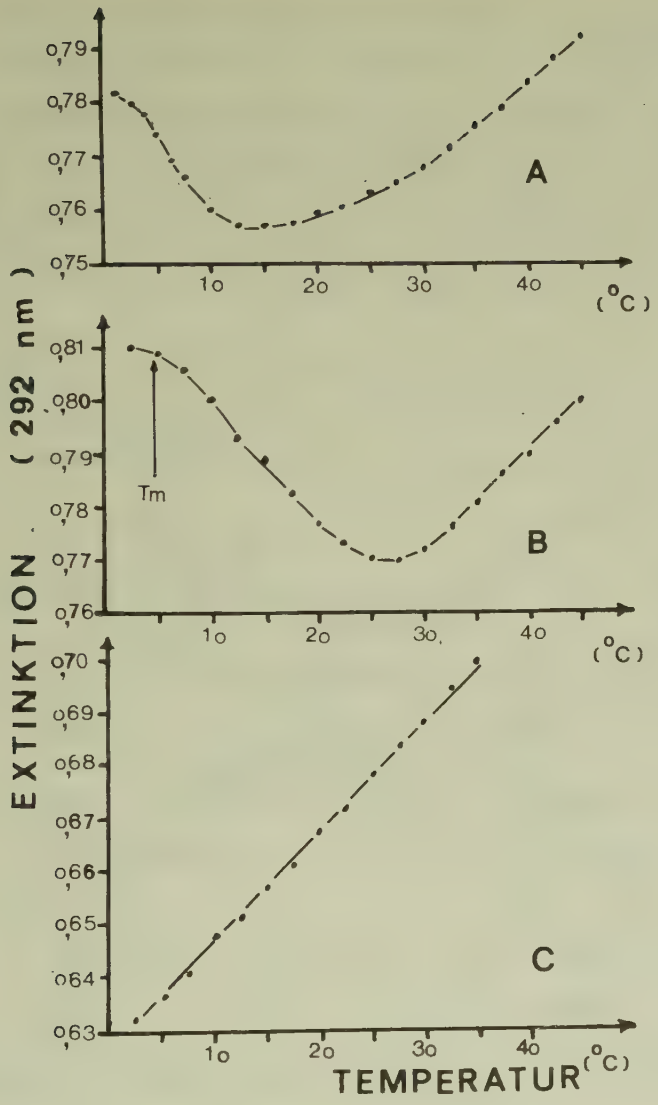


Abb. 4: Schmelzverhalten eines Komplexes aus A-A-A-U-C-A-C-C-A und G-A-U-U-U

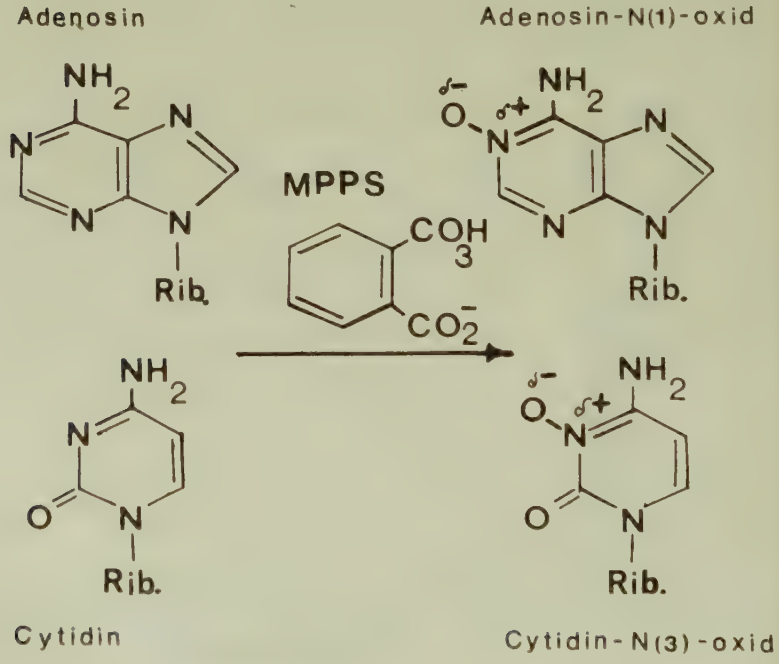
A) 10^{-4} M Nona- und Pentanucleotid, 0.01 M Na-Cacodylatpuffer pH 6.9.

B) 10^{-4} M Nona- und Pentanucleotid, 0.24 M Phosphatpuffer pH 7.0.

C) 10^{-4} M Nonanucleotid, 0.24 M Phosphatpuffer pH 7.0.

4. N-Oxidation

Die Oxidation von Nucleobasen mit Monoperphthalsäure (MPPS) wurde von Frederikson und Klenow[18] erstmalig durchgeführt. Es wurde bei pH 5 Desoxiadenosin und Desoxiadenosinmonophosphat zu den jeweiligen 1-N-Oxiden oxidiert. Die Oxidation von Cytosinderivaten mit MPPS zu ihren N-Oxiden konnte Cramer et al.[19] zeigen.



In weiteren Versuchen war es auch möglich, Poly A bzw. Poly C mit MPPS zu oxidieren[2o]. Hierbei konnte Seidel[21] zeigen, daß die Oxidation von Poly A

in der Startphase einer Geschwindigkeitsgleichung 2. Ordnung gehorcht. Bei weiteren Oxidationsversuchen der Systeme Poly A + Poly U bzw. Poly C + Poly G wurde eine völlige Inhibierung der Oxidation festgestellt[22]. Mit diesem Ergebnis, verbunden mit der Strukturaufklärung von Adenosin-(N1)-oxid und Cytidin-(N3)-oxid, konnte gezeigt werden, daß die Oxidation von Adenin bzw. Cytosin verhindert wird, sobald die (N1)-Position beim Adenin bzw. (N3)-Position beim Cytosin durch Wasserstoffbrücken blockiert ist.

Damit war eine Methode entwickelt worden, die geeignet ist, die prozentuale Zusammensetzung von Basenpaaren in Nucleinsäuren zu studieren. Diese Methode ermöglichte Cramer[23], das Modell einer Tertiärstruktur von tRNA vorzuschlagen.

4a) Oxidation des Nonanucleotids A-A-A-U-C-A-C-C-A

Das Schmelzverhalten der komplementären Oligonucleotide G-A-U-U-U und A-A-A-U-C-A-C-C-A zeigte, daß unter Bedingungen von 0.24 M Phosphatpuffer pH 7.0 und einer Nucleotidkonzentration von 10^{-4} M bei $4^{\circ}C$ eine Komplexbildung von 50 % vorliegt. Die weiteren Versuche zur N-Oxidation wurden daher bei einer Nucleotidkonzentration von 10^{-3} M bei $0^{\circ}C$ durchgeführt, um das Gleichgewicht

$$\text{G-A-U-U-U} + \text{A-A-A-U-C-A-C-C-A} \rightleftharpoons \left[\begin{matrix} 3' \text{A-C-C-A-C-U-A-A-A} \\ \text{G-A-U-U-U} \end{matrix}\right]$$

in Richtung Komplex zu verschieben. Es wurde erwartet, daß unter diesen Bedingungen ein stabiler Komplex ausgebildet wird, in dem die Adenin-Anteile besser gegen N-Oxidation geschützt werden.

Bei den N-Oxidationsversuchen wurde immer ein 100-facher Überschuß an MPPS

gewählt, bezogen auf Molarität der jeweils zu untersuchenden Systeme. Mit diesem hohen Überschuß an Oxidans wurde beabsichtigt, eine Reaktion zu erhalten, die einer Geschwindigkeitsgleichung pseudo 1. Ordnung gehorcht. Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurde die Zeitabhängigkeit der N-Oxidation beim Nonanucleotid verfolgt.

Aus dem Reaktionsansatz wurde nach entsprechenden Zeiten jeweils ein Aliquot von 1.0 - 1.5 OD entnommen. Nach MPPS-Abtrennung, Entsalzung und totaler enzymatischer Spaltung wurden die Proben im Nucleosidanalysator identifiziert.

Ein typisches Analysenprofil eines 4 Stunden oxidierten Nonanucleotids ist in Abb. 5 wiedergegeben. Im Vergleich dazu das nicht-oxidierte Ausgangsprodukt. Nach 4-stündiger Oxidation wurden 64.6 % 3'-terminales Adenosin (Peak 1) und 20.5 % Cytidin oxidiert (Peak 2). Diese Auswertung ermöglichte Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Oxidation. Verfolgt man die Reaktion über 12 Stunden, so erhält man für die Adenosin- und Cytidin-Oxidation zwei Reaktionen, die unabhängig voneinander verlaufen. Die Abnahme des nicht-oxidierten Adenosin- bzw. Cytidin-Anteils wurde halblogarithmisch über die Zeit aufgetragen (Abb. 6).

Bei der graphischen Darstellung von log (% Umsatz) gegen die Zeit t erhält man eine Gerade, mit der Neigung -k/2.303, aus der man direkt k ermitteln kann. Damit folgt die N-Oxidation unter den angegebenen Bedingungen einer Geschwindigkeitsgleichung pseudo 1. Ordnung.

$$k = 1/t \times \ln (A_o/A_o - X) \quad \tau_{1/2} = \ln 2/k$$

Für die Bildung des 3'-terminalen Adenosin-(N1)-oxid beträgt $k_1 = 72 \times 10^{-6}$/sec

$$\tau_{1/2} = 2.67 \text{ [h]}$$

Für die Bildung von Cytidin-(N3)-oxid beträgt $k_2 = 10 \times 10^{-6}$/sec

$$\tau_{1/2} = 19.3 \text{ [h]}$$

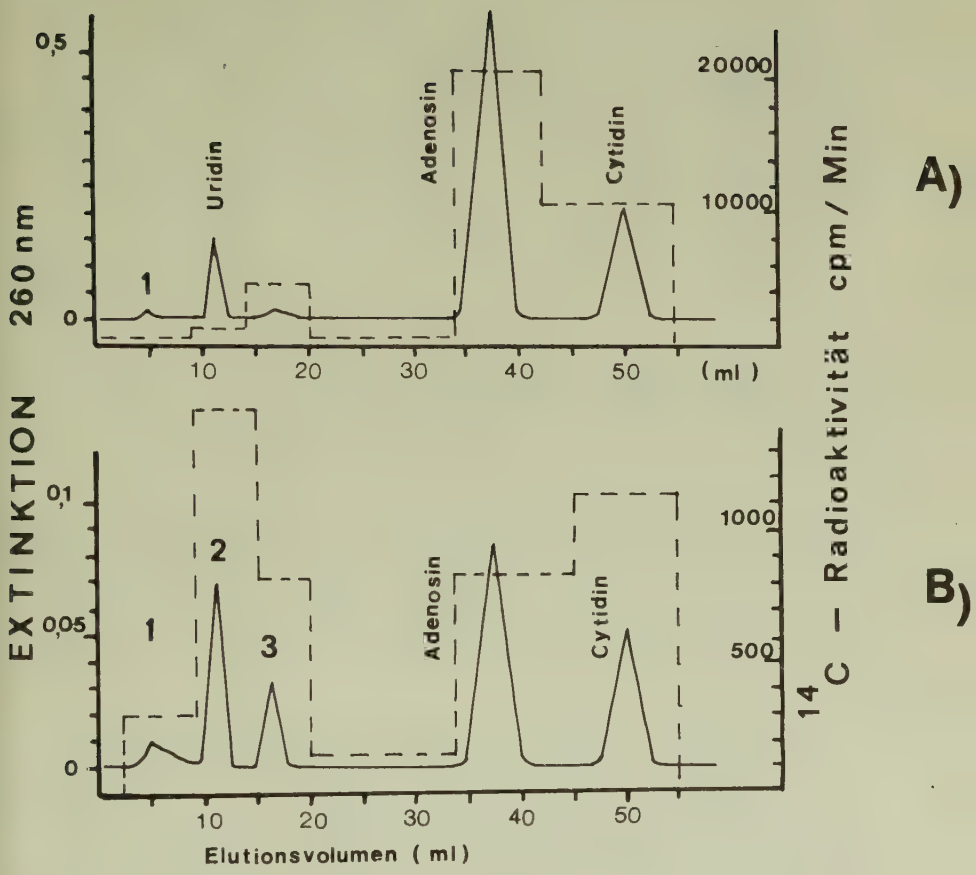


Abb. 5: Elutionsprofil einer Nucleinsäureanalyse.

A) Analyse des A-A-A-U-C-A-C-C-A nach Totalhydrolyse, Peak 1 = Durchbruchvolumen.

B) Analyse des A-A-A-U-C-A-C-C-A nach 4-stündiger Oxidation und anschließender Totalhydrolyse. Peak 1 = Durchbruchvolumen, Peak 2 = Adenosin-(N1)-oxid + Uridin, Peak 3 = Cytidin-(N3)-oxid.

(——) Extinktion 260 nm, (---) [^{14}C]-Radioaktivität.

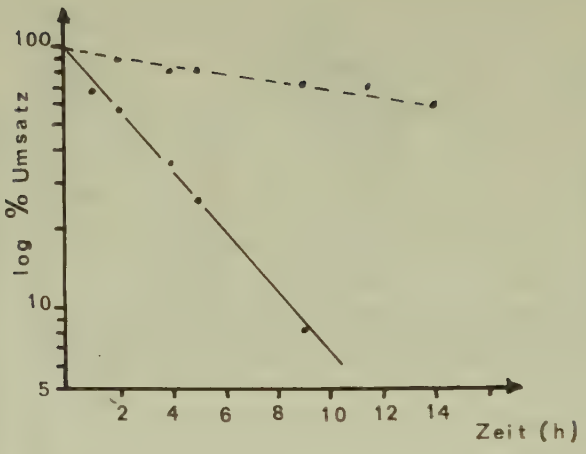


Abb. 6: Zeitliche Abhängigkeit der Abnahme des nicht N-oxidierten 3'-terminalen Adenosin (•——•) und des Cytidin (•----•) aus dem Nonanucleotid A-A-A-U-C-A-C-C-A durch Nucleosidanalyse des nicht-oxidierten Adenosin- bzw. Cytidin-Anteils nach entsprechenden Oxidationszeiten.

4b) Oxidation eines Komplexes aus A-A-A-U-C-A-C-C-A und G-A-U-U-U

Aufgrund der N-Oxidationskinetik des Nonanucleotids wurde bei dieser Untersuchung zur Komplexbildung eine Oxidationszeit von 2 Std. gewählt, da sich nach dieser Zeit gut reproduzierbare Werte des nicht N-oxidierten 3'-terminalen Adenosins erhalten lassen.

Eine 1 : 1 Mischung aus 10^{-3} M Nona- und Pentanucleotid in 0.24 M PO_4-Puffer pH 7.0 wurde bei $0^{\circ}C$ 2 Std. oxidiert. Das Reaktionsgemisch wurde durch Chromatographie bei pH 7.5 in MPPS, Nona- und Pentanucleotid aufgetrennt und das Nonanucleotid einer Analyse unterzogen. Parallel dazu wurde das Nonanucleotid allein oxidiert und analysiert. Beim Vergleich beider Oxidationsversuche

konnte ein Schutz gegen N-Oxidation überraschenderweise nicht gefunden werden, denn es wurden in beiden Fällen 55 % des Adenosin-Anteils oxidiert. Ein solcher Schutz wurde erwartet, da nach den Schmelzkurven Nona- und Pentanucleotide unter diesen Bedingungen als Komplex vorliegen. Eine Erhöhung des Adenosin-Anteils würde auf eine Blockierung der (N1)-Position des Adenosins durch H-Brücken hinweisen, wie im System Poly A/Poly U gezeigt wurde[20].

4c) N-Oxidation von tRNA

Die Oxidation von 1.2 x 10^{-4} M $tRNA^{Phe}$ aus Hefe in 0.4 M Phosphatpffer pH 7.0 und 3 x 10^{-1} M MPPS wurde von Cramer et al.[24] untersucht. $tRNA^{Phe}$ wurde 8 Std. bei 20°C oxidiert. Unter diesen Bedingungen erhielt man eine maximale Oxidation von tRNA innerhalb 6 - 8 Std. Der Oxidationsgrad wurde durch den Quotienten A_{232}/A_{259} bestimmt, wobei man sich die hohe Absorption des A-(N1)-Oxid bei 232 nm zunutze machte. Es wurden dabei drei Adeninbasen im Anticodon loop (A_{35}, A_{36}, A_{38}), sowie das 3'-terminale Adenosin oxidiert.

In dieser Arbeit wurde die N-Oxidation von tRNA bei 0°C durchgeführt. 10^{-3} M tRNA wurde mit 10^{-1} M MPPS in 0.24 M Phosphatpuffer pH 7.0 oxidiert. $tRNA^{Phe}$-C-C-A wurde mit 0.25 % $tRNA^{Phe}$-C-C-[^{3}H]-A_{76} versetzt und oxidiert. $tRNA^{Val}$ wurde mit 1.3 % $tRNA^{Val}$-[^{14}C]-C-[^{14}C]-C-[^{14}C]-A_{76} versetzt und oxidiert. Durch diese radioaktive Markierung des 3'-terminalen Endes der tRNA wurde die spätere Identifizierung der isolierten Nona- und Pentanucleotide erleichtert.

$tRNA^{Phe}$ und $tRNA^{Val}$ wurden jeweils einer 48-stündigen Oxidation unterworfen um maximale Oxidierbarkeit zu erhalten. Zur Identifizierung oxidierter Positionen am 3'-Ende wurden beide tRNAs nach Entsalzen einer T_1-Ribonuclease-

Spaltung unterworfen. Das 3'-terminale Pentanucleotid aus $tRNA^{Phe}$ sowie das 3'-terminale Nonanucleotid aus $tRNA^{Val}$ wurde durch Chromatographie bei pH 7.5 isoliert.

Die Auftrennung der N-oxidierten Oligonucleotide wurde durch Rechromatographie des Nona- bzw. Pentanucleotids bei pH 3.5 erhalten. Dabei erhielt man eine Auftrennung von Oligonucleotiden gleicher Kettenlänge nach N-oxidierten Basenpositionen. Die Ursache dieses chromatographischen Verhaltens ist in den unterschiedlichen pK-Werten der Nucleobasen zu finden[25]. Bei der pH-7.5-Chromatographie kommt nur die negative Phosphatladung zum Tragen. Man erhält hierbei eine Trennung der Oligonucleotide nach Phosphatladungen, also nach unterschiedlicher Kettenlänge. Die pK-Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Nucleosid	pK-Wert
Adenosin	3.5[26]
Cytidin	4.2[26]
Adenosin-(N1)-oxid	2.25[27]
Cytidin-(N3)-oxid	3.4[28]

In Abbildung 7 ist das Profil der pH 3.5-Chromatographie vom N-oxidierten Nonanucleotid aus der $tRNA^{Val}$ und den N-oxidierten Pentanucleotiden aus $tRNA^{Phe}$ aufgeführt. Die parallel durchgeführte Radioaktivitätsmessung der Eluate ermöglichte die Zuordnung der einzelnen Peaks zum jeweiligen 3'-terminalen Oligonucleotid. Die einzelnen radioaktiven Fraktionen wurden einer enzymatischen Totalhydrolyse unterworfen. Anschließend wurde die Bruttobasenzusammensetzung im Analysator bestimmt. Dabei wurden die in Tabelle 2

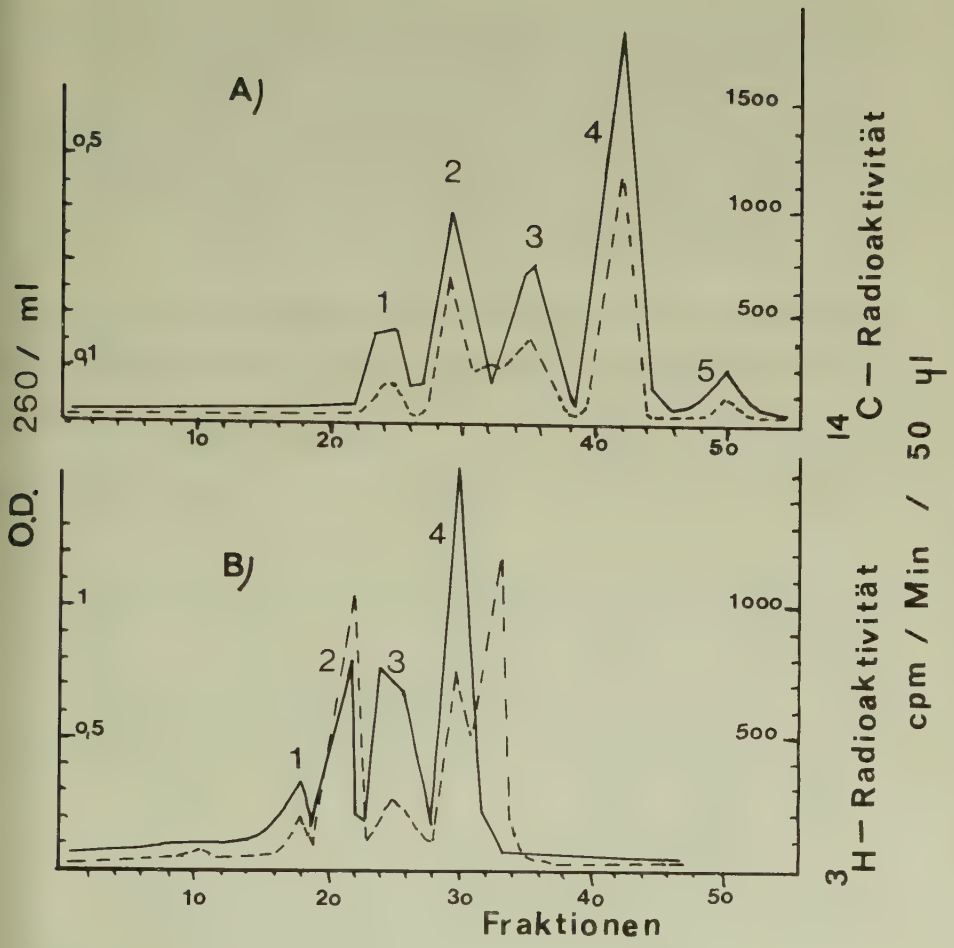


Abb. 7: Elutionsprofil der chromatographischen Trennung N-oxidierter Oligonucleotide an DEAE-52 Zellulose (Cl^--Form). Säulendimension: 0.5 x 100 cm. Linearer Gradient: 2 x 500 ml von 0.0 - 0.1 M NaCl in 7 M Harnstoff pH 3.5, 7.5 ml/Fraktion.
(---) OD_{260}/ml, (——) Radioaktivität.

Fortsetzung Legende Abb. 7:

A) Trennung N-oxidierter 3'-terminaler Nonanucleotide aus $tRNA^{Val}$-C-C-A nach 48-stündiger Oxidation der $tRNA^{Val}$. Peak 1 = 3' Å-Ć-C-A-C-U-A-A-A, Peak 2 = 3' Å-Ć-C-A-C-U-A-A-A, Peak 3 = 3' Å-Ć-C-Å-C-U-A-A-A, Peak 4 = 3' Å-C-C-Å-C-U-A-A-A, Peak 5 = 3' Å-C-C-Å-C-U-A-A-A.

B) Trennung N-oxidierter 3'-terminaler Pentanucleotide aus $tRNA^{Phe}$-C-C-A nach 48-stündiger Oxidation der $tRNA^{Phe}$. Peak 1 = 3' Å-Ć-C-A-C, Peak 2 = 3' Å-C-C-A-C, Peak 3 = 3' Å-C-C-Å-C, Peak 4 = 3' Å-C-C-Å-C.

aufgeführten N-oxidierten Basenpositionen gefunden. Die Unterscheidung zwische oxidiertem C_{74} und C_{75} war nicht möglich und wurde in Tabelle 2 und Abb. 7 wie folgt zum Ausdruck gebracht: 3' $Å_{76}$-C°_{75}-C_{76}-A-C-U-A-A-A. Die Unterscheidung war nicht möglich, da beide Cytidine bei $tRNA^{Val}$ ^{14}C -markiert waren. Bei $tRNA^{Phe}$ hatte C_{75} und C_{74} keine Markierung.

Tabelle 2

3'-Terminale Nonanucleotide aus $tRNA^{Val}$-C-C-A_{76} nach 48-stündiger N-Oxidation der $tRNA^{Val}$.

	N-oxidierte Basenpositionen	prozentuale Zusammensetzung
Peak 1 3' Å-Ć-C-A-C-U-A-A-A	2	9.8 %
Peak 2 3' Å-C-C-A-C-U-A-A-A	2	19.5 %
Peak 3 3' Å-C-C-Å-C-U-A-A-A	3	19.7 %
Peak 4 3' Å-C-C-Å-C-U-A-A-A	4	43.6 %
Peak 5 3' Å-C-C-Å-C-U-A-A-A	5	8.0 %

3'-Terminale Pentanucleotide aus $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} nach 48-stündiger N-Oxidatio der $tRNA^{Phe}$.

	N-oxidierte Basenpositionen	prozentuale Zusammensetzung
Peak 1 3' Å-Ć-C-A-C	2	8.6 %
Peak 2 3' Å-C-C-A-C	2	19.2 %
Peak 3 3' Å-C-C-Å-C	3	26.6 %
Peak 4 3' Å-C-C-Å-C	4	45.6

Oxidierte man tRNA unter den angegebenen Bedingungen, so wurde das 3'-Ende zu 45 % voll oxidiert. Dieses Ergebnis wurde sowohl bei der $tRNA^{Val}$ als auch bei der $tRNA^{Phe}$ gefunden. Dabei wurde eindeutig in beiden tRNAs eine Oxidation des Cytidins nachgewiesen. Modifizierte Oligonucleotide der Zusammensetzung $\overset{\circ}{A}$-C-C-$\overset{\circ}{A}$-C-U-A-A-A bzw. $\overset{\circ}{A}$-C-C-$\overset{\circ}{A}$-C wurden nicht gefunden. Dieses Ergebnis weist auf einen möglichen sequenziellen Angriff der MPPS am 3'-Ende hin.

Die prozentuale Zusammensetzung der N-oxidierten Oligonucleotide zeigte in beiden tRNAs nahezu die gleiche Verteilung. Als einziger wesentlicher Unterschied ist Peak 5 bei $tRNA^{Val}$ herauszustellen. Hierbei handelt es sich um eine zusätzliche Cytidin-Oxidation im stem der $tRNA^{Val}$, die bei $tRNA^{Phe}$ nicht gefunden wurde.

4d) Kinetik der N-Oxidation bei $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} und $tRNA^{Phe}$-C-C_{75}

Die N-Oxidationskinetik beim Nonanucleotid zeigte, daß die Oxidation des Cytidins um den Faktor 6 langsamer verläuft als die A-Oxidation. Inwieweit dieses Oxidationsverhalten auch für die tRNA zutrifft, wurde im folgenden Versuch abgeklärt.

Ausgegangen wurde von einer [^{3}H]-markierten $tRNA^{Phe}$-C-C-[^{3}H]-A_{76} sowie einer $tRNA^{Phe}$-C-[^{14}C]-C_{75}. Beide tRNAs wurden der N-Oxidation unter angegebenen Bedingungen unterworfen. Nach entsprechenden Zeiten wurde jeweils ein Aliquot von 15 OD_{260} entnommen, entsalzt und eine Endgruppenanalyse durchgeführt. In Abbildung 8 ist das Analysenprofil der Pankreasspaltung einer $tRNA^{Phe}$-C-C-[^{3}H]-A_{76} wiedergegeben, die 4 Std. oxidiert wurde. Im Vergleich dazu das Ausgangsmaterial.

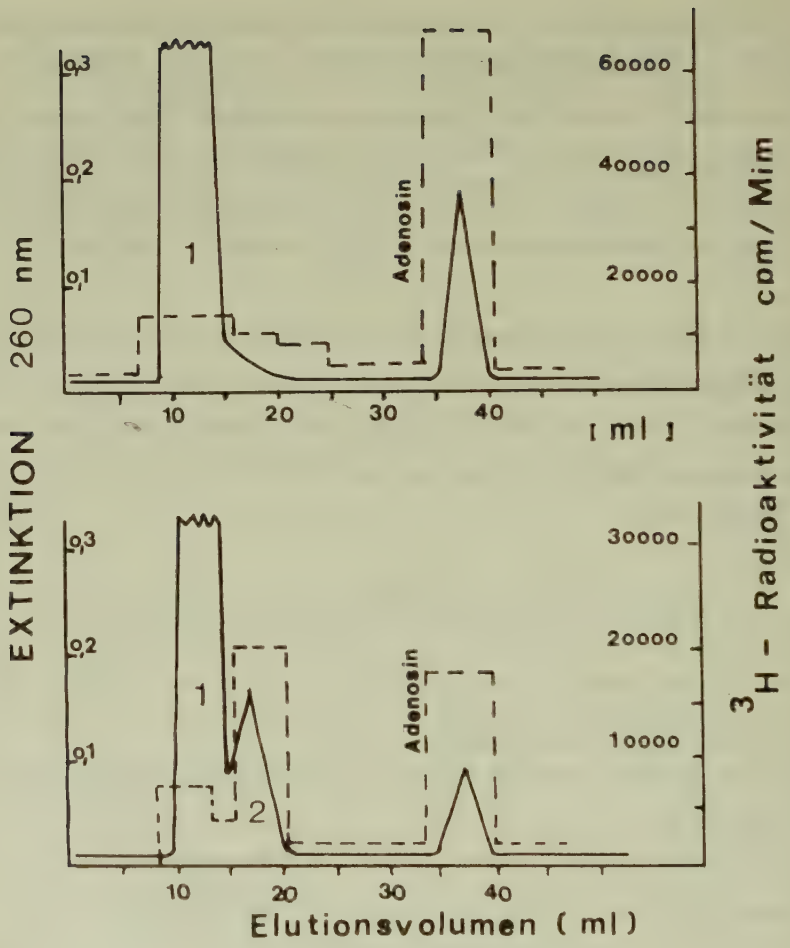


Abb. 8: Elutionsprofil der Endgruppenbestimmung des A_{76} der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76}.

A) Endgruppenanalyse von $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76}, Peak 1 = Durchbruchvolumen

B) Endgruppenanalyse von $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} nach 4-stündiger Oxidation. Peak 1 = Durchbruchvolumen, Peak 2 = Adenosin-(N1)-oxid.

(——) Extinktion 260 nm, (---) Radioaktivität.

Die zeitliche Abnahme des A_{76} bzw. C_{75} ist in Abbildung 9 wiedergegeben.

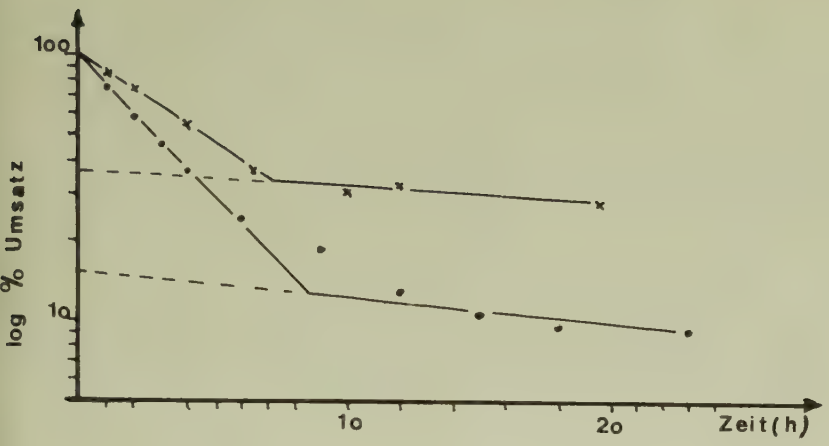


Abb. 9: Zeitliche Abhängigkeit der Abnahme des nicht-oxidierten A_{76} der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} (•—•) und des nicht-oxidierten C_{75} der $tRNA^{Phe}$-C-C_{75} (x—x) durch Endgruppenanalyse der nicht N-oxidierten 3'-terminalen Nucleoside Adenosin und Cytidin nach entsprechenden Oxidationszeiten. (---) Extrapolation auf die Zeit t = O.

Verfolgt man die Oxidation von $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} und $tRNA^{Phe}$-C-C_{75} über 24 Std. so erhält man bei einem 100-fachen Überschuß an MPPS jeweils zwei Parallel-Reaktionen pseudo 1. Ordnung, die mit verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten ablaufen[50].

$$A \xrightarrow{k_1} C$$

$$B \xrightarrow{k_2} C$$

Durch die halblogarithmische Auftragung log % Umsatz gegen die Zeit t erhält man je 2 Geraden.

Für die ersten 8 Std. galten die Zeitgesetze:

$$\frac{d[A]}{d\,t} = k_1[A] \qquad \text{und} \qquad \frac{d[B]}{d\,t} = k_2[B]$$

$$\log ([C]_\infty - [C]) = \log ([A]_e\, e^{-k_2 t} + [B]_o\, e^{-k_2 t})$$

Im späteren Verlauf der Reaktion galt:

$$\log ([C]_\infty - [C]) = \log [B]_o\, e^{-k_2 t}$$

Durch Differenzbildung $A = [C]_\infty - [C] - B$ läßt sich die Gesamtreaktion in zwei Teilreaktionen zerlegen, wobei sich aus den Neigungen der Geraden jeweils die Geschwindigkeitskonstanten ermitteln ließen.

$$k = \frac{\Delta \ln ([A]o - X)}{\Delta t}$$

Für das A_{76} der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} beträgt $k_A = 87.5 \times 10^{-6}$/sec

t/2 = 2.2 (h)

$k_B = 6.4 \times 10^{-6}$/sec

t/2 = 30 (h)

Für das C_{75} der $tRNA^{Phe}$-C-C_{75} beträgt $k'_A = 42.5 \times 10^{-6}$/sec

t/2 = 4.55 (h)

$k'_B = 8.75 \times 10^{-6}$/sec

t/2 = 22.0 (h)

Verglich man die Oxidationskinetiken der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} mit der des Nonanucleotids so fand man in beiden Fällen für die Oxidierbarkeit des A_{76} nahezu die gleichen Geschwindigkeitskonstanten. Dagegen reagiert das endständige C_{75} in der $tRNA^{Phe}$-C-C_{75} um den Faktor 4 schneller als das Cytidin im Nonanucleotid. Damit konnte gezeigt werden, daß sich Nucleobasen innerhalb einer

Nucleotidkette in einer geschützten Position befinden und somit einem Angriff von MPPS schwerer zugänglich sind.

4e) Analyse partiell oxidierter $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76}

Die beschriebenen Oxidationsversuche von tRNA mit MPPS bei $0^{o}C$ zeigten, daß die Nucleobasen im -C-C-A Ende unterschiedlich stark angegriffen werden. Es wurde daher versucht abzuklären, inwieweit der Angriff der MPPS bei tRNA statistisch oder sequenziell verläuft.

Aus den kinetischen Untersuchungen zur N-Oxidation von $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} geht hervor, daß zwei Parallel-Reaktionen stattfinden. Innerhalb der ersten 4 Stunden der Oxidation lag schnell reagierendes A_{76} vor. Nach 12-stündiger Oxidation war das schnell reagierende A_{76} völlig verschwunden. Von nun ab lief nur die Oxidation des langsam reagierenden A_{76} ab.

Um zu untersuchen, inwieweit dieses unerwartete Oxidationsverhalten auch auf das C_{75} bzw. C_{74} zutraf, wurde $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} einmal 4 Stunden und einmal 12 Stunden im präparativen Maßstab oxidiert.

Nach Abtrennung der 3'-terminalen Pentanucleotide durch T_1-RNase-Spaltung und Chromatographie bei pH 7.5 erfolgte die Auftrennung der N-oxidierten Pentanucleotide durch Chromatographie bei pH 3.5 (Abb. 1o). Die Bruttobasenzusammensetzung der N-oxidierten Oligonucleotide wurde nach beschriebenen Verfahren analysiert und in Tabelle 3 aufgeführt.

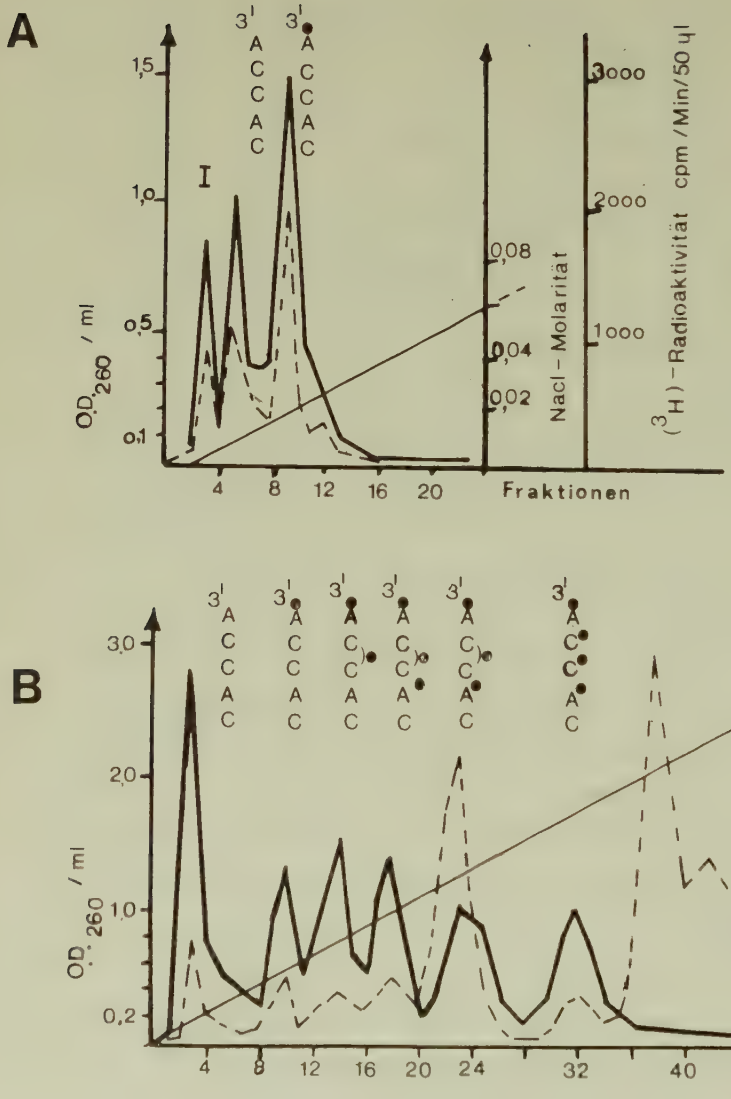


Abb. 10: Elutionsprofil der chromatographischen Trennung N-oxidierter 3'-terminaler Pentanucleotide aus $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} an DEAE-52 Zellulose (Cl^--Form). Säulendimension: 0.5 x 100 cm, linearer Gradient: 2 x 500 ml von 0.0 - 0.1 M

Fortsetzung Legende Abb. 10: NaCl in 7 M Harnstoff pH 3.5, 7.5 ml/Fraktion.
A) Nach 4-stündiger Oxidation der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76}, Peak 1 = kurzkettige Bruchstücke nicht oxidierten Pentanucleotids.
B) Nach 12-stündiger Oxidation der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76}. (---) OD_{260} nm/ml, (——) [^{3}H]-Radioaktivität.

Tabelle 3

3'-Terminale Pentanucleotide aus $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} nach 4-stündiger N-Oxidation.

	N-oxidierte Basenpositionen	prozentuale Zusammensetzung
Peak 1 Bruchstücke des 3' A-C-C-A-C	0	17.7 %
3' A-C-C-A-C	0	28.10 %
3' Ao-C-C-A-C	1	54.20 %

3'-Terminale Pentanucleotide aus $tRNA^{Phe}$-C-C-A nach 12-stündiger N-Oxidation.

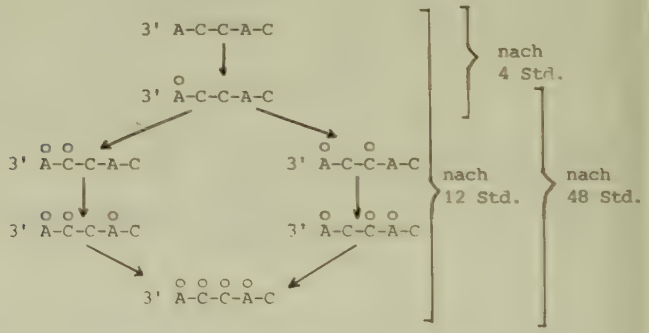
	N-oxidierte Basenpositionen	prozentuale Zusammensetzung
3' A-C-C-A-C	0	9.35 %
3' Ao-C-C-A-C	1	13.9 %
3' Ao-Co-C-A-C	2	13.25 %
3' Ao-Co-C-Ao-C	3	18.2 %
3' Ao-Co-C-A-Co	3	23.4 %
3' Ao-Co-Co-A-C	4	21.8 %

Dieser Versuche zeigte, daß nach 4-stündiger Oxidation nur das A_{76} in der $tRNA^{Phe}$ angegriffen wird. Eine Cytidin-Oxidation konnte nicht nachgewiesen werden. Nach 12-stündiger Oxidation wurde eine ausgeglichene Verteilung von Adenosin- und Cytidin-Oxidation gefunden. Es wurde hierbei die Modifikation Ao-Co-C-A-C und 2 mal die Modifikation Ao-Co-C-A-Co gefunden.

In Verbindung mit den Ergebnissen in Tabelle 4 kann folgender sequenzieller Angriff von MPPS am 3'-terminalen Ende der tRNA angenommen werden.

Tabelle 4

Sequenzieller Angriff von MPPS am 3'-C-C-A Ende der tRNA.



4f) Partielle N-Oxidation des Pentanucleotids C-A-C-C-A$^{3'}$

Um zu erklären, daß der gefundene sequenzielle Ablauf der N-Oxidation bei tRNA keine generelle Eigenschaft von Oligonucleotiden ist, wurde das 3'-terminale Pentanucleotide C-A-C-C-A$^{3'}$ aus tRNA^{Phe} einer 4-stündigen Oxidation unterworfen. Nach MPPS-Abtrennung und Entsalzung wurde das N-oxidierte Produkt an DEAE-52 Zellulose bei pH 3.5 aufgetrennt (Abb. 11). Die Ergebnisse der Nucleosidanalyse der getrennten Pentanucleotide sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

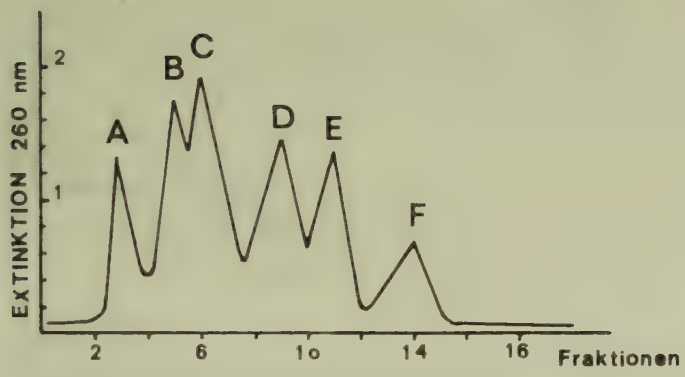


Abb. 11: Elutionsprofil der chromatographischen Trennung von N-oxidierten Pentanucleotiden nach 4-stündiger Oxidation des Pentanucleotids C-A-C-C-A. 3'

Peak A = Bruchstücke nicht oxidierten Pentanucleotids. Peak B = 3' A-C-C-A-C, Peak C = 3' $\overset{\circ}{A}$-C-C-A-C, Peak D = 3' $\overset{\circ}{A}$-C-C-$\overset{\circ}{A}$-C, Peak E = 2 $\overset{\circ}{A}$ + 1 $\overset{\circ}{C}$ + 2 C, Peak F = 2 $\overset{\circ}{A}$ + 2 $\overset{\circ}{C}$ + 1 C

Tabelle 5

3'-Terminale Pentanucleotide nach 4-stündiger N-Oxidation des Pentanucleotids.

Peak		N-oxidierte Basenpositionen	prozentuale Zusammensetzung
A	Bruchstücke nicht oxidierten Pentanucleotids	0	15.1 %
B	3' A-C-C-A-C	0	18.8 %
C	3' $\overset{\circ}{A}$-C-C-A-C	1	17.1 %
D	3' $\overset{\circ}{A}$-C-C-$\overset{\circ}{A}$-C	2	19.8 %
E	2 $\overset{\circ}{A}$, 1 $\overset{\circ}{C}$, 2 C	3	18.7 %
F	2 $\overset{\circ}{A}$, 2 $\overset{\circ}{C}$, 1 C	4	10.5 %

Peak 1, das Durchbruchvolumen, enthält kurzkettige Bruchstücke des nicht oxidierten Pentanucleotids. Bei Peak 2, 3 und 4 wurde keine Cytidin-Oxidation

gefunden. In Peak 4 wurde die Modifikation 3' $\overset{\circ}{A}$-C-C-$\overset{\circ}{A}$-C eluiert, die bei der Oxidation von $tRNA^{Phe}$ nicht auftrat. In Peak 5 wurde ein Cytidin, in Peak 6 werden zwei Cytidine oxidiert. Bei $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} wurde unter identischen Bedingungen nur A_{76} oxidiert.

Aufgrund dieser Verteilung sowie der relativ homogenen Zusammensetzung der N-oxidierten Produkte kann geschlossen werden, daß der Angriff von MPPS beim Pentanucleotid C-A-C-C-A 3' statistisch erfolgt.

5. Versuche zur biologischen Aktivität partiell N-oxidierter $tRNA^{Phe}$

In Kapitel 4d wurde die Kinetik der N-Oxidation von $tRNA^{Phe}$ beschrieben. Parallel zur dabei durchgeführten Endgruppenanalyse des A_{76} wurde die Aminoacylierbarkeit des oxidierten tRNA-Gemisches getestet. Die Menge an zugesetzter Phenylalanin-tRNA-Synthetase wurde so hoch gewählt, daß nach 5 Min. maximale Aminoacylierungsgeschwindigkeit erzielt wurde. Die Aminoacylierbarkeit der nicht-oxidierten Ausgangs-$tRNA^{Phe}$ wurde mit 100 % angesetzt.

Verfolgt man die Aminoacylierung über 24 Std., so erhielt man eine lineare Abnahme, die identisch mit der Abnahme des nicht-oxidierten A_{76} verlief (Abb. 12).

Um zu untersuchen, ob die Aminoacylierung bei $tRNA^{Phe}$ nur von der Oxidation des A_{76} abhängt oder ob andere oxidierte Positionen in der tRNA für die reduzierte Aminoacylierung verantwortlich waren, wurden folgende Versuche durchgeführt.

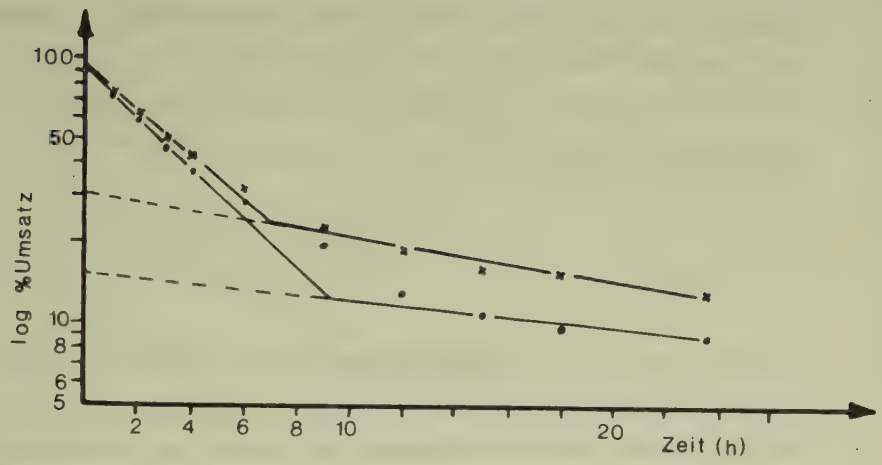


Abb. 12: Darstellung der zeitlichen Abhängigkeit der Abnahme des nicht-oxidierten A_{76} der $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} (.—.) durch Endgruppenanalyse nach entsprechenden Oxidationszeiten und der dazu parallel getesteten Aminoacylierbarkeit (x——x). (---) Extrapolation auf die Zeit t = 0.

$tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} wurde einmal 4 Std. und einmal 12 Std. oxidiert. Nach Entsalzen wurden beide tRNA-Ansätze einer limitierten SVD-Spaltung unterworfen, indem das oxidierte terminale A_{76} bzw. C_{75} abgespalten wurde. Parallel dazu wurde das nicht-oxidierte Ausgangs-$tRNA^{Phe}$ mit SVD behandelt. Getestet wurde der Einbau von [^{14}C]-A_{76} mittels [^{14}C]-ATP und Nucleotidyltransferase. Die Aminoacylierbarkeit wurde mit [^{14}C]-Phenylalanin und Phenylalanin-tRNA-Synthetase getestet. 46 % einer $tRNA^{Phe}$ konnten nach 4-stündiger N-Oxidation aminoacyliert werden.

Dagegen konnte nach SVD-Behandlung einer 4 Stunden oxidierten tRNA 72 % ATP eingebaut werden, während nur 52 % der tRNA aminoacyliert wurden. Ein ähnliches Ergebnis erhielt man, wenn $tRNA^{Phe}$ 12 Std. oxidiert wurde. Hierbei konnten

58 % ATP in eine SVD-behandelte tRNA eingebaut werden, während nur 20 % tRNA aminoacylierbar waren. Damit konnte festgehalten werden, daß ein intaktes 3'-Ende einer $tRNA^{Phe}$ nicht ausreicht zur Aminoacylierung, sofern andere Bereiche in der tRNA modifiziert sind. Nucleotidyltransferase scheint außerdem N-oxidierte Bereiche in der tRNA eher zu tolerieren als Synthetase.

III. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde versucht, Modellsubstanzen darzustellen und damit den 3'-C-C-A stem der $tRNA^{Val}$ zu simulieren. Vergleichende Studien mit der tRNA sind jedoch nur möglich, wenn folgende Voraussetzungen gegeben sind:

1. Relativ gleiche Stabilität von Modell und tRNA.
2. Identische Stöchiometrie.
3. Die Ausbildung von H-Brücken als Charakteristikum des 3'-C-C-A stem der tRNA.

Das Verhalten von kurzkettigen Oligonucleotiden wurde von Pörschke im Oligo A/Oligo U-System untersucht[17]. Die besondere Schwierigkeit dieses Systems besteht darin, Bedingungen zu finden, unter denen bevorzugt doppelsträngige Helices vorliegen. Während bei hohen Salzkonzentrationen (1 M) vorwiegend Trippelhelices ausgebildet werden, sind bei niedriger Salzkonzentration (0.01 M) Doppelhelices vorherrschend. Niedrige Ionenstärke bedeutet jedoch verminderte Stabilität der Doppelhelix. Folglich muß die Nucleotidkonzentration erhöht werden um das Gleichgewicht monomer zur Helix in Richtung Helix zu verschieben. Außerdem ist die Stabilität von der Kettenlänge abhängig. Je kürzer die Kette desto instabiler ist die Helix. So bildet z.B. ein System aus Oligo A + Oligo U mit weniger als 8 Basenpaaren sowohl Doppel- als auch Trippelhelices aus.

Die Charakterisierung eines A/U-Systems mit weniger als 8 Basenpaaren gelang Doty[29]. Er gibt für sein System (10^{-4} M Oligos, 1 M Na^+, pH 7.0) folgende T_m-Werte an:

1. A-A-A-U-U-U
   U-U-U-A-A-A $\quad T_m = -13^oC$

2. A-A-A-A-U-U-U
   U-U-U-A-A-A-A $\quad T_m = -3^oC$

3. A-A-A-A-A-U-U-U
   U-U-U-A-A-A-A-A $\quad T_m = +3^oC$

Für den Fall 2 und 3, in denen nicht basengepaarte angestackte Adenosine vorliegen, konnte Doppelhelixbildung nachgewiesen werden. Ebenso konnte im folgenden System von Heterooligonucleotiden eine Doppelhelix nachgewiesen werden[30]:

A-A-G-C-U-U
U-U-C-G-A-A $\quad T_m = +10^oC$

Vergleicht man die Stabilität durch Berechnung der freien Energie ΔG für basengepaarte Bereiche, so ergibt sich nach Tinoco[31] für das System

A-A-A-A-A-U-U-U
U-U-U-A-A-A-A-A $\quad \Delta G_{25^oC} = -6.6$ Kcal

Für das hier behandelte System aus Nona- und Pentanucleotid

3' A-C-C-A-C-U-A-A-A
G-A-U-U-U $\quad \Delta G_{25^oC} = -6.4$ Kcal

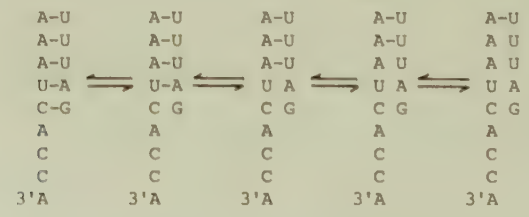
Obwohl bei Doty für die oben angeführten 3 Beispiele mit 6 A-U Basenpaaren bei dieser Berechnung die gleiche Stabilität kalkuliert wurde, jedoch unterschiedliche T_m-Werte gefunden wurden, vermutet man, daß die überstehenden Basen zu einem erhöhten stacking beitragen. Der dadurch bedingte Gewinn an

G erleichtert die Ausbildung von H-Brücken.

Für das in dieser Arbeit untersuchte System aus 3' A-C-C-A-C-U-A-A-A
G-A-U-U-U
ein T_m-Wert von $4^{\circ}C$ gefunden, der damit im Bereich der soeben diskutierten Systeme liegt. Dies würde für die gemessene Konzentration von 10^{-3} M bedeuten, daß weit über 50 % eines helikalen Komplexes zu erwarten wäre. Trotzdem konnte ein Schutz der (N1)-Position des Adenosins durch H-Brücken gegenüber einem Angriff von MPPS nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis läßt folgende alternative Erklärungen zu:

Unter den angegebenen Bedingungen findet eine Ausbildung von H-Brücken nicht statt, sondern nur die Ausbildung Trippel-strängiger Aggregate. Zwar wurde ein kooperativer Schmelzeffekt gefunden, der jedoch nicht notwendigerweise ein Indikator für Wasserstoffbrücken ist, sondern nur einen Zustand höherer Ordnung charakterisiert.

Eine andere Erklärung ist darin zu finden, daß unvollständige Helixbildungen vorliegen, die miteinander im Gleichgewicht stehen[32]. Hiergegen spricht die Kooperativität des Schmelzverhaltens.



Als dritte mögliche Erklärung bietet sich an, daß in kurzen Ketten der H-Brückenschutz der (N1)-Position des A nicht ausreicht, wie er für das langkettige Poly A/Poly U-System nachgewiesen wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen

kommt Doty, der die äußerst geringe Stabilität des Komplexes A-G-C-U gegen-
                                                                U-C-G-A
über A-A-G-C-U-U nicht erklären kann.
U-U-C-G-A-A

Die Extrapolation polymerer Systeme auf so kurzkettige Systeme wäre dann nicht statthaft. Damit konnte keine der eingangs geforderten Prämissen erfüllt werden.

1. Der T_m-Wert von tRNA liegt bei 75°C[33]. tRNA ist damit um den Faktor 20 stabiler als die Modellsubstanz.
2. Über die Stöchiometrie der Modellsubstanz bestehen nach der bisherigen Literatur unterschiedliche Auffassungen.
3. Die Wasserstoffbrückenausbildung ist zwar denkbar, konnte aber nicht bestätigt werden.

Es wurde daher versucht, die besondere chemische Natur der tRNA mittels der N-Oxidation zu erhellen. Dabei beschränkten sich die Versuche auf die Reaktiv-site der tRNA, das -C-C-A Ende.

Ordnet man die helikalen Bereiche der Sekundärstruktur von $tRNA^{Val}$ im Sinne der Tertiärstruktur von Rich, so ergeben sich für den zusammengesetzten 3'-C-C-A stem (hU + C-C-A stem) insgesamt 11 Basenpaare mit H-Brücken gegenüber 5 Basenpaaren im Modell des 3'-C-C-A stems. Die zusätzlichen 6 Basenpaare ergeben bezüglich der N-Oxidation folgenden gravierenden Unterschied der tRNA zur Modellsubstanz:
Oxidiert man $tRNA^{Phe}$ bei 0°C mit einem 100-fachen Überschuß an MPPS so findet ein sequenzieller Angriff von MPPS am -C-C-A Ende der $tRNA^{Phe}$ statt. Das heißt, die Adenin- und Cytidinanteile im -C-C-A Ende werden jeweils unterschiedlich schnell oxidiert. Zuerst wird das A_{76} oxidiert. Das A_{73} wird jedoch erst angegriffen, wenn das C_{75} bzw. C_{74} oxidiert wurde. Dieser Befund

stützt sich einmal auf die ausgereifte Analytik der Sequenzanalyse von Oligonucleotiden, sowie auf die Fraktionierung N-oxidierter Oligonucleotide nach modifizierten Basenpositionen an DE-52 Zellulose bei pH 3.5. Frühere Ergebnisse zur N-Oxidation von $tRNA^{Phe}$ bei 20°C zeigen die ausschließliche Oxidation des A_{76} und stehen somit im Widerspruch zu den Befunden dieser Arbeit[24].

Einen ähnlichen sequenziellen Angriff des -C-C-A Endes erhält man bei limitierender Sapltung mit SVD[7]. Diese Daten führten zur Überlegung, daß sich das 3'-Ende der tRNA in einer geschützten Position befindet. Es blieb daher zu klären, inwieweit die reduzierte Reaktivität des -C-C-A Endes durch Basenstacking determiniert ist oder durch Involvierung des -C-C-A Endes in die Tertiärstruktur der tRNA[34]. Oxidiert man $tRNA^{Val}$ 48 Std. so erhält man einen zusätzlichen Angriff von MPPS am C_{72} im -C-C-A stem, der bei $tRNA^{Phe}$ nicht gefunden wurde. Dieses Ergebnis läßt sich aufgrund der unterschiedlichen Stabilität beider -C-C-A stems erklären. Bei $tRNA^{Phe}$ werden zwischen drei terminalen G-C Paaren H-Brücken ausgebildet, davon besteht ein Basenpaar aus A:U, das um den Faktor 3 instabiler ist als G:C[31]. In Übereinstimmung mit Kearns[35] wäre folgende Erklärung möglich: Da in der $tRNA^{Val}$ Uridin und Guanosin keine H-Brücken ausbilden, wird das terminale G-C_{72} labilisiert und das C_{-2} somit angreifbar. Dagegen hat $tRNA^{Phe}$ drei terminale G-C Paare, die relativ stabil sind.

Nach diesen Ergebnissen müßte der -C-C-A stem der $tRNA^{Val}$ in einer offeneren Form vorliegen als bei $tRNA^{Phe}$. Da $tRNA^{Val}$ gegenüber MPPS ein ähnliches Oxidationsverhalten zeigt wie $tRNA^{Phe}$, läßt sich in diesem Fall die Stabilität des -C-C-A Endes bei $tRNA^{Val}$ durch Basenstacking erklären.

Ein weiteres Argument, daß für Basenstacking als Ursache der verminderten Reaktivität spricht, ergibt sich aus der N-Oxidationskinetik von $tRNA^{Phe}$-C-C_{75}. Innerhalb der ersten 6 Std. reagiert das C_{75} um den Faktor 4 schneller als das Cytidin des Nonanucleotids A-A-A-U-C-A-C-C-A. Im Nonanucleotid liegt das Cytidin innerhalb der Nucleotidkette und wird durch Basenstacking geschützt. Dagegen befindet sich das C_{75} der $tRNA^{Phe}$ in einer exponierten Position und ist somit leichter angreifbar. Die Aussage, daß die reduzierte Reaktivität des -C-C-A Endes damit seine alleinige Ursache im Basenstacking hat, wurde jedoch durch folgende Versuche eingeschränkt:

Verfolgt man die Zeitabhängigkeit der N-Oxidation über 20 Std., so erhält man bei $tRNA^{Phe}$-C-C_{75} sowie bei $tRNA^{Phe}$-C-C-A_{76} je zwei Parallelreaktionen pseudo 1. Ordnung mit gemeinsamem Produkt ($\overset{o}{A}_{76}$ bzw. $\overset{o}{C}_{75}$), die mit verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 ablaufen. Dies setzt wiederum voraus, daß z.B. das A_{76} der $tRNA^{Phe}$ in zwei unterschiedlichen Formen vorliegt, eine geschützte Form B und eine leicht zugängliche Form A.

$$A \xrightarrow{k_1} A \text{ oxidiert}$$

$$B \xrightarrow{k_2} B \text{ oxidiert}$$

Dabei können die oxidierten Formen von A und B durchaus identisch sein. Es scheint daher also, daß auch $tRNA^{Phe}$ in wässriger Lösung in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegt. Dafür spricht auch das Kristallisationsverhalten von $tRNA^{Phe}$, das zu polymorphen Kristallen führt[8,9]. Beide tRNA-Formen sind zudem aminoacylierbar. Bestimmt man die Kinetik nicht über die Abnahme des A_{76} sondern über die Abnahme der Aminoacylierbarkeit der $tRNA^{Phe}$, so erhält man die gleiche Charakteristik zweier Parallelreaktionen pseudo 1. Ordnung.

Die Abnahme der Aminoacylierung verläuft innerhalb der ersten 6 Std. analog zur Abnahme des A_{76}. Im späteren Verlauf der Oxidation wird ca. 10 % mehr aminoacyliert als intaktes A_{76} vorhanden ist. Inwieweit dieses Ergebnis artifiziell ist wird noch diskutiert. Durch Extrapolation der zweiten Geraden auf die Zeit t = 0 läßt sich die relative prozentuale Zusammensetzung beider Konformationen ermitteln. Sie beträgt für A = 66 %, für B = 33 %. Dieses Ergebnis stimmt mit den Arbeiten von Sprinzl überein. Hierbei wurde durch Bisulfit Modifikation des -C-C-A Endes der $tRNA^{Phe}$ trotz langer Reaktionszeiten eine Restaktivität von 30 % gefunden.

Die Ursache der Reaktivität des -C-C-A Endes der tRNA ist demnach nicht allei im Basenstacking zu finden, sondern zusätzlich durch Involvierung des -C-C-A Endes in eine Tertiärstruktur der tRNA.

Oxidiert man in $tRNA^{Phe}$ am 3'-Terminus ausschließlich das A_{76}, so erhält man nach SVD-Behandlung und Regenerierung mit ATP + Nucleotidyltransferase einen ATP-Einbau in $tRNA^{Phe}$ von 72 %. Die Aminoacylierbarkeit einer so behandelten tRNA beträgt jedoch nur 52 %. Vor SVD-Behandlung betrug die Aminoacylierbarkeit der N-oxidierten $tRNA^{Phe}$ 46 %. Es konnte somit festgestellt werden, daß der Einfluß des N-oxidierten A_{76} der $tRNA^{Phe}$ auf die Aminoacylierung unwesentlich ist. Damit haben die vergleichenden Ergebnisse zur N-Oxidationskinetik mittels Endgruppenanalyse des A_{76} und der Aminoacylierung eine reale Basis. Für die reduzierte Aminoacylierbarkeit müssen oxidierte Bereiche in der tRNA verantwortlich sein, deren Oxidierbarkeit mit der gleichen Geschwindigkeit ve laufen, wie die des A_{76}. Unter den hier angegebenen Oxidationsbedingungen ist nach von der Haar[24] sicher das Anticodon -A-A-A oxidiert. Außerdem können Basen in den exponierten loop-Regionen modifiziert sein. Aus der Sicht der N-Oxidation ergeben sich damit für die Synthetaseerkennungsregion bei $tRNA^{Phe}$

folgende Überlegungen:

Als Erkennungsregionen kommen neben einem intakten -C-C-A Ende die loop-Regionen als katalytisch essentielle Bereiche in Frage. Dem Anticodon könnte dabei neben hU + Extra-loop eine bevorzugte Stellung zukommen[37]. Sieht man diese Vorstellung aus der Prespektive der Zelle als ökonomisch arbeitendes System, so könnte die lineare Information im Anticodon nicht nur der mRNA als Erkennungsregion dienen, sondern auch der Synthetase[38].

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß G-A-U-U-U und A-A-A-U-C-A-C-C-A bei einer Nucleotidkonzentration von 10^{-4} M in 0.24 M Phcsphatpuffer pH 7.0 einen Komplex bilden, dessen T_m-Wert bei 4°C liegt. Durch N-Oxidation dieses Komplexes mit Monoperphthalsäure (MPPS) bei einer Nucleotidkonzentration von 10^{-3} M konnte ein zu erwartender Schutz der (N1)-Position der Adenosine durch Wasserstoffbrücken nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu waren die basengepaarten Bereiche des -C-C-A stems der $tRNA^{Phe}$ nicht oxidierbar mit Ausnahme des nicht basengepaarten -C-C-A Endes. Dabei wurde folgender sequenzieller Angriff von MPPS gefunden:

1. Das A_{76} der $tRNA^{Phe}$-A_{73}-C_{74}-C_{75}-A_{76} wurde zuerst oxidiert.
2. Das C_{74} bzw. C_{75} wurde erst nach Oxidation des A_{76} oxidiert.
3. Das A_{73} der tRNA ist nur dann oxidierbar, wenn zuvor das C_{73} bzw. C_{74} oxidiert war.

Im Vergleich dazu waren die Adenosine bzw. Cytidine im C-A-C-C-A einer Oxidation gleich gut zugänglich.

Der Vergleich der N-Oxidierbarkeit der Cytidine C_{75} und C_{74} im A-A-A-U-C-A-C_{74}-C_{75}-A mit der Oxidierbarkeit des C_{75} in der $tRNA^{Phe}$-C-C_{75} ergab, daß die Cytidine des Nonanucleotids um den Faktor 4 langsamer oxidiert werden als das terminal C_{75} in der $tRNA^{Phe}$-C-C_{75}. Diese unterschiedliche Reaktivität der Basen im -C-C-A Ende der tRNA kann durch verschieden starke hydrophobe Wechselwirkungen erklärt werden.

Die zeitliche Abhängigkeit der Oxidierbarkeit des A_{76} der $tRNA^{Phe}$ ergab ein zweiphasiges Profil, zu dem sich die Aminoacylierung korrellieren ließ. In der Anfangsphase ist eine schnelle Oxidation des A_{76} und im späteren Verlauf eine langsame Oxidation zu beobachten. Diese zweiphasige Charakteristik läßt auf zwei unterschiedliche Zustände des A_{76} der tRNA in wässriger Lösung schließen, eine geschützte und eine für MPPS leicht zugängliche Form.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Materialien

Folgende Materialien wurden verwendet:

1. DEAE-Zellulose Typ Whatman DE-52 von Hormuth-Vetter, Wiesloch/Baden.
2. Biogel P-2 (100 - 200 mesh) von BioRad Laboratories, Richmond/Calif.
3. Aquasol von New England Nuclear, St. Albany, Boston, Mass., U.S.A.
4. 5'G-A und Na_3UDP von Waldhof, Mannheim.
5. [^{3}H]ATP 50 mC/mmol, [^{14}C]CTP 46.6 mC/mmol und [^{14}C]Aminosäure Phenylalanin 50 mC/mmol (stanstar grade) von Schwarz Bioresearch, New York, U.S.A.
6. Polynucleotidphosphorylase (E.C. 2.7.7.8.), Schlangengiftphosphodiesterase SVD 1 mg/ml (E.C. 3.1.4.1.), Ribonuclease A 1 mg/ml (E.C. 2.7.7.16),

alkalische Phosphatase 1 mg/ml (E.C. 3.1.3.1.) von Boehringer, Mannheim, T_1-Ribonucléase (E.C. 2.7.7.26) von Sankyo, Tokyo.

7. tRNA-Nucleotidyltransferase (E.C. 2.7.7.6.) wurde freundlicherweise von Dr. H. Sternbach präpariert[39].
8. Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (E.C. 6.1.1.) und Valyl-tRNA-Synthetase wurde freundlicherweise von Dr. F. von der Haar zur Verfügung gestellt[4o].
9. $tRNA^{Phe}$ wurde nach einem Verfahren von Schneider et al.[41] hergestellt. Die Aufreinigung von $tRNA^{Val}$ aus Hefe wurde in der Staatsexamensarbeit von R. Solfert[42] beschrieben.
1o. Alle anderen Reagenzien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

2. Allgemeine Methoden

2a) Schmelzkurven von Oligonucleotiden

Die Schmelzkurven wurden aufgenommen bei einer Oligonucleotidkonzentration von 10^{-4} M in 0.24 M Phosphat-Puffer pH 7.0, bzw. 0.01 M Cacodylat-Puffer pH 6.9. Gemessen wurde in Quarzküvetten mit einem Lichtweg von 1 cm bei einer Wellenlänge von 292 nm in einem Zeiss PMQ II Spectrophotometer, das mit einem automatischen Probenwechsler ausgerüstet war. Der Küvettenhalter war thermostatisiert. Die Temperatur wurde mittels eines Pt-100-Widerstandes in der Meßküvette gemessen und über ein digitales Voltmeter simultan mit den logarithmisch verstärkten Extinktionswerten über einen Teletyplochstreifenschreiber in einem Lochstreifen gespeichert[43].

Die graphische Auswertung der Schmelzkurven und deren T_m-Wert-Kalkulation erfolgte über einen UNIVAC 6000 Computer. Das Programm zur Auswertung von Nucleinsäureschmelzkurven wurde von A. Rabczenko[44] entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2b) N-Oxidation von Oligonucleotiden

Das Oxidationsmittel Monoperphthalsäure (MPPS) wurde nach Payne[45] herge-
stellt und die ätherische Lösung bei -20°C aufbewahrt. Ihre Konzentration
wurde titrimetrisch mit KJ und Thiosulfat bestimmt. 1 ml = 3.12 x 10^{-4} mol
Vor jedem Oxidationsansatz wurde 1 ml ätherische MPPS mit 0.9 ml H_2O versetzt
durch vorsichtiges Evakuieren wurde das Oxidans in die wässrige Phase über-
führt und mit ca. 100 λ 5 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt.

Oligonucleotide wurden im Vacuum zur Trockne eingeengt, mit 0.4 M Phosphat-
puffer pH 7.0 aufgenommen und mit MPPS (1.12 x 10^{-4} mol/ml) oxidiert. Die
Oxidation wurde bei 0°C im Dunkeln durchgeführt. Durch MPPS-Abfärbung an
DE-81 wurde die Oxidation nach entsprechenden Zeiten zum Stillstand gebracht.
Der Reaktionsansatz enthielt in molaren Mengen 10^{-3} M Oligonucleotide, 0.2
PO_4-Puffer pH 7.0 und 10^{-1} M MPPS. Die Molaritäten der zu N-oxidierenden
Oligonucleotide wurden durch Summation aus den einzelnen Extinktionskoeffi-
zienten der Nucleoside $\varepsilon = \frac{260}{260}$ bei pH 7.0 bestimmt. Eine eventuelle UV-Abs
durch stacking wurde vernachlässigt.

A-A-A-U-C-A-C-C-A	10^{-8} Mol = 1.137 ($OD^{\star}$/ml)
G-A-U-U-U	10^{-8} Mol = 0.591 (OD/ml)
C-A-C-C-A	10^{-8} Mol = 0.575 (OD/ml)

2c) N-Oxidation von tRNA

tRNA wurde analog zu den Oxidationsbedingungen der Oligonucleotide oxidiert
Der Reaktionsansatz enthielt tRNA 10^{-3} M, MPPS 10^{-1} M, PO_4-Puffer pH 7.0
0.24 M.

---

*) 1 OD = eine A_{260} Einheit 1 Absorption λ_{max} = 260 nm bei 1 cm Schichtdicke

Bei der Oxidation von $tRNA^{Val}$ wurde dem Ansatz 1.1 x 10^{-5} M ^{14}C-markierte $tRNA^{Val}$ zugefügt, bezogen auf 10_{260} einer markierten $tRNA^{Val}$. Bei der Oxidation von $tRNA^{Phe}$ wurde dem Ansatz 0.25 x 10^{-5} M ^{3}H-markierte $tRNA^{Phe}$ zugesetzt. Für die prozentuale Berechnung der tRNA-Menge wurde 1 OD_{260} mit 1.3×10^{-5} M angesetzt.

2d) Phosphatgradienten-Säulen-Chromatographie

Das Reaktionsgemisch wurde nach der Oxidation mit H_2O 1 : 10 verdünnt und auf eine DEAE-Zellulosesäule (1.5 x 8 cm, Chloridform) aufgegeben, die zuvor mit 0.04 M Tris-HCl-Puffer pH 7.6 äquilibriert war.
MKPA wurde mit 0.1 M NaCl so lange gewaschen, bis keine UV-absorbierende Substanz mehr zu registrieren war. Oligonucleotide bzw. tRNA wurden sodann mit 1 M NaCl eluiert.

2e) Entsalzung von Oligonucleotiden

a) 1 M Harnstoff: Die Lösung von 50 - 100 ml 1 M Harnstoff wurden auf pH 7.5 gebracht, 1 : 2 mit H_2O verdünnt und über eine DEAE-Zellulosesäule pH 7.5, 2.5 x 2 cm, gegeben. Nach vollständigem Harnstoff wurde mit H_2O ausgewaschen und die Oligonucleotide mit 1 M NaCl eluiert.

b) NaCl: NaCl-Lösungen wurden bis zur Sättigung konzentriert und in maximal 10 ml auf eine Biogel P-2-Säule (1.5 x 35 cm, gegeben. Eluiert wurde mit H_2O. Nach 30 ml Durchlauf erhielt man die Oligos in reiner wässriger Fraktion.

2f) T_1-Ribonucleasespaltung von tRNA

Die Spaltung wurde unter der von Salzberger[11] publizierten Bedingungen

durchgeführt. 10 ml Reaktionsvolumen enthielten 1.5×10^{-6} M tRNA, 10^{-1} M Tris-HCl Puffer pH 7.65 und 2.500 Einheiten T_1-RNase. Das Reaktionsgemisch ließ man 18 Std. bei 37°C inkubieren. Die Reaktion wurde zum Stillstand gebracht durch Einstellen mit Harnstoff auf 7 M.

2g) Säulenchromatographische Trennung von Oligonucleotiden

Chromatographie bei pH 7.5: Reaktionsgemische von Oligonucleotiden wurden mit NaCl auf 0.1 M, mit Harnstoff auf 7 M und mit HCl auf pH 7.5 eingestellt und auf eine DEAE-Zellulosesäule aufgezogen. Die DEAE-Säule wurde zuvor mit 0.1 M NaCl und 7 M Harnstoff pH 7.5 äquilibriert. Die Trennung der Oligonucleotide erfolgte durch Anlegung eines linearen Gradienten von 0.1 M bis 0.3 M NaCl in 7 M Harnstoff pH 7.5. Die Pentanucleotide erhielt man bei einer NaCl-Konzentration von 0.2 M, das Nonanucleotid bei einer Konzentration von 0.24 M NaCl.

Chromatographie bei pH 3.5: Salzfreie Oligonucleotid-Gemische wurden mit Harnstoff auf 7 M und mit HCl auf pH 3.5 eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine DEAE-Zellulosesäule aufgezogen, die zuvor mit 7 M Harnstoff pH 3.5 äquilibriert war. Die Trennung der Oligonucleotide erfolgte mittels eines linearen Gradienten von 0.0 bis 0.1 M NaCl in 7 M Harnstoff pH 3.5. Die Dimensionen der Säulen bzw. Gradienten werden im Ergebnisteil spezifiziert.

2h) Sequenzanalyse von Oligonucleotiden

2h1) Hydrolyse von Oligonucleotiden

Oligonucleotide wurden durch enzymatische Hydrolyse zu Nucleosiden bzw. zu Nucleotiden gespalten.

a1) Endgruppenbestimmung von tRNA durch Hydrolyse mit Pankreasribonuclease A (E.C. 2.7.7.16.).

Reaktionsansatz: 10 λ tRNA ca. 5 - 10 OD_{260}

5 λ Ammoniumacetat pH 7.5, 0.2 M

5 λ RNase A 1 mg/ml

Das Reaktionsgemisch ließ man 4 Std. bei 37°C inkubieren.

a2) Totalhydrolyse von Oligonucleotiden mit SVD (Schlangengiftphosphodiesterase E.C. 3.1.4.1.) und alkalischer Phosphatase (E.C. 3.1.3.1).

Reaktionsansatz: 0.1 - 1 (OD) Substrat + 5 µl 1 M Ammoniumacetat pH 8.8

5 µl Schlangengiftphosphodiesterase (10 mg/ml)

5 µl alk. Phosphatase (1 mg/ml)

5 µl 0.1 M $MgCl_2$

Das Reaktionsgemisch ließ man 4 Std. bei 45°C inkubieren. Bei N-oxidierten Oligonucleotiden hat es sich als zweckmäßig herausgestellt, zusätzlich 5 µl Pankreasribonuclease A hinzuzugeben[46] und insgesamt 18 Std. zu inkubieren. Das Reaktionsgemisch wurde mittels einer Hamilton-Spritze in die Säule eingespritzt.

2h2) Analyse von Nucleosiden

Prinzip: Die Nucleoside werden mit einem Analysator nach Uziel[47] analysiert. Die Substanzen werden an einer Kationenaustauschersäule getrennt und im Durchfluß spektralanalytisch bei zwei Wellenlängen identifiziert und quantitativ bestimmt. Negativ geladene Substanzen wie Nucleotide erhielt man im Durchbruchvolumen. Die Nucleoside wurden aufgrund ihrer verschiedenen pK-Werte getrennt.

Methode: Als Träger diente eine 0.5 x 25 cm Aminex A-6 Säule (BioRad). Die Nucleoside wurden bei 45°C mit 0.4 M Ammoniumformiat-Puffer pH 4.65 und konstanter Flußgeschwindigkeit von 0.3 ml/Min. eluiert. Alle Produkte, die eine negative Ladung tragen erhielt man im Durchbruch.

Die spektralphotometrische Auswertung wurde bei 260 nm und 280 nm durch eine Wellenlängenwechselautomatik vorgenommen (Beckman Spektralphotometer DBT), die mit 10 µl Durchflußküvetten ausgestattet war. Die Absorption einer Wellenlänge wurde alle 10 Sek. über einem Schreiber festgehalten.

Bei einem Papiervorschub von 12 cm/Std. erhielt man:

$\overset{o}{A}$ + U nach 5 cm ≙ 12.5 ml Elutionsvolumen[+)]

$\overset{o}{C}$ nach 7 cm ≙ 17.5 ml Elutionsvolumen[+)]

A nach 15 cm ≙ 31.25 ml Elutionsvolumen

C nach 20 cm ≙ 50.0 ml Elutionsvolumen

$\overset{o}{A}$ und U werden nicht getrennt. Sie chromatographieren zusammen in einer Fraktion.

Auswertung: Die eluierten Substanzen wurden in Fraktionen aufgefangen und wie folgt identifiziert:

$\overset{o}{C}$ und $\overset{o}{A}$ konnten aufgrund ihrer Spektren qualitativ im Eluat nachgewiesen werden. Adenosin-(N1)-oxid zeigte zwei Maxima bei 232 nm und 260 nm. Cytidin-(N3)-oxid zeigte ebenfalls zwei Maxima bei 224 nm und 271 nm.

+) $\overset{o}{A}$ = Adenosin-(N1)-oxid

$\overset{o}{C}$ = Cytidin-(N3)-oxid

Die quantitative Auswertung erfolgte einmal durch numerische Integration der eluierten Peaks[23].

$$\frac{\text{Peakhöhe}^{1)} \times \frac{\text{Punktzahl}}{6} \times \text{Flußgeschwindigkeit (ml/Min)}}{\varepsilon_{260}} = \text{nM}$$

Die zweite Möglichkeit der quantitativen Auswertung erfolgte auf Basis der Radioaktivität. Die Eluate, 1 - 2 ml, wurden mit 10 ml Aquasol versetzt, im Szintillationszähler ausgezählt und der prozentuale Anteil der nicht-oxidierten Produkte auf Basis cpm/Min. bestimmt.

2i) Standardansatz für die Aminoacylierung[48]

Zur Charakterisierung der tRNA wurde ihre spezifische Beladbarkeit mit Aminosäuren durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verwandt. Die Reaktion wurde durch folgende Gleichung beschrieben:

1. Aminosäure + ATP + Enzym $\rightleftharpoons$ (Aminoacyl-AMP-Enzym) + PPi
2. (Aminoacyl-AMP-Enzym) + tRNA $\rightleftharpoons$ Aminoacyl-tRNA + AMP

Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl und enthielt in molaren Konzentrationen 0.15 M Tris-HCl Puffer pH 7.6, 0.2 M KCl, 0.05 M $MgSO_4$, 5 mM ATP, 60 µM [^{14}C]-Aminosäure und 90 µg Serumalbumin.

Um vor Beginn der Reaktion des 3'-Ende der tRNA zu regenerieren, fügte man zunächst pro 1 OD tRNA eine Enzymeinheit^{+}Nucleotidyltransferase hinzu und inku-

---

1) Peak = Absorption 260 nm/Zeit

Peakhöhe = maximale Absorption 260 nm

$^{+}$Eine Enzymeinheit katalysiert den Einbau von einem nMol ATP/Min. in die tRNA.

bierte 5 Min. bei 32°C. Anschließend wurde die Aminoacylierung durch Zugabe der Synthetase gestartet. Dem 100 µl Reaktionsansatz wurden nach 5, 10 und 15 Min. 10 µl-Proben entnommen, auf Whatman 3MM Papier (2.4 cm Ø) plattiert und zur Zählung auf folgende Weise vorbereitet: Die Plättchen wurden 3 mal 15 Min. mit je 500 ml 5 % Trichloressigsäure gewaschen, anschließend 5 Min. in Äthanol geschwenkt und nach Spülen in Äther unter Infrarotlampe getrocknet. Die Auswertung erfolgte im Szintillationszähler (Packard Typ 3375).

Zur Ermittlung des Zähleruntergrundes diente die Aktivität einer 10 µl-Probe, die dem Reaktionsansatz vor Synthetasezugabe entnommen wurde.

3. Spezielle Methoden

3a) Präparation von [^{14}C]-markierter tRNA^{Val}-C-C-A$_{OH}$

Die Präparation wurde in Zusammenarbeit mit H. Sternbach[49] durchgeführt. Die tRNA-Nucleotidyltransferase katalysiert folgende Reaktion:

$$tRNA^{Val}\text{-A} + [^{14}C]ATP + [^{14}C]CTP \underset{\text{pH 7.5}}{\overset{\text{pH 9}}{\rightleftharpoons}} tRNA^{Val}\text{-A-}[^{14}C]\text{-C-}[^{14}C]\text{-C-}[^{14}C]\text{-A} + 3\ PP_i$$

Bot man in dieser Reaktion bei pH 7.5 radioaktives ATP + CTP sowie PPi im Überschuß an, so wurde zunächst die nicht markierte tRNA^{Val}-C-C-A abgebaut. Gleichzeitig lief jedoch der Einbau von [^{14}C]ATP + [^{14}C]CTP mit verminderter Regenerierungsgeschwindigkeit ab. Bei dieser Austauschreaktion erhielt man eine [^{14}C]-Markierung des 3'-Endes der tRNA^{Val}.

Reaktionsansatz: 6 ml Reaktionsvolumen enthielten 580 nMol tRNA^{Val}-C-C-A, 3100 nMol [^{14}C]ATP und 6000 nMol [^{14}C]CTP. Die Lösung war 10 mM an Aminoacyl-puffer pH 7.5, 0.1 M an KCl, 10 mM an Mg^{2+}, 1 mM an EDTA.

Nach Zusatz von 2700 Einheiten Nucleotidyltransferase ließ man den Ansatz 7 Std. bei 32°C inkubieren. Anschließend wurden die Mononucleotide über eine Sephadex A-25 Säule (2 x 10 cm) durch Waschen mit 0.5 M NaCl abgetrennt. Danach wurde die $tRNA^{Val}$ mit 1 M NaCl eluiert.

1 OD_{260} $tRNA^{Val}$-[^{14}C]-C-[^{14}C]-C-[^{14}C]-A zeigte eine Aktivität von 150.000 cpm/Min.

3b) Präparation von [^{3}H]-markierter $tRNA^{Phe}$-C-C-A

Es wurde von einer $tRNA^{Phe}$ aus Hefe ausgegangen, die nach einem Verfahren von Schneider et al.[41] aufgereinigt war. Die vollständige Regenerierung des 3'-Endes mittels Nucleotidyltransferase erfolgte jedoch erst nach vollzogener Aufreinigung. Hierbei wurde in dem von Schneider[41] angegebenen Regenerierungsansatz [^{3}H]ATP statt kaltem ATP angeboten.

$$tRNA^{Phe}\text{-C-C}_{75} + [^{3}H]ATP \underset{Mg^{++}}{\overset{pH\ 9}{\rightleftharpoons}} tRNA^{Phe}\text{-C-C-}[^{3}H]\text{-A}_{76} + PPi$$

Die Abtrennung nicht umgesetzter Mononucleotide erfolgte an einer Sephadex A-25 Säule (2 x 10 cm, Chloridform, pH 7.0) durch Waschen mit 0.5 M NaCl. $tRNA^{Phe}$ wurde mit 1 M NaCl eluiert.

1 OD_{260} $tRNA^{Phe}$-C-C-[^{3}H]-A_{76} zeigte eine Aktivität von 600.000 cpm/Min.

3c) Präparation [^{14}C]-markierter $tRNA^{Phe}$-C-C_{75}

Die Präparation wurde nach Sprinzl et al.[28] durchgeführt. 3 ml Reaktionsansatz enthielten 300 OD $tRNA^{Phe}$-C-C-A = 4.5 x 10^{-7} M, 12 µg SVD, 0.01 M Tris-HCl pH 7.65 und 10 mM $MgSO_4$. Das Reaktionsgemisch ließ man 60 Min. bei 20°C

inkubieren. Anschließend wurde das Gemisch auf eine Sephadex A-25 Säule (2 x 10 cm) aufgezogen und die Monomere mit 0.5 M NaCl eluiert. tRNA wurde mit 1 M NaCl eluiert.

Die SVD-behandelte tRNA wurde in einem Regenerierungsansatz nach Schneider et al.[41] mit [^{14}C]CTP und Nucleotidyltransferase regeneriert. Die Abtrennung der Monomere erfolgte wiederum an einer Sephadex A-25 Säule. tRNA wurde mit 1 M NaCl eluiert.

Die Endgruppenanalyse dieser tRNA zeigte eine [^{14}C]-Markierung des C_{-5} zu 80 % und des C_{74} zu 20 %.

1 OD_{260} $tRNA^{Phe}$-C-[^{14}C]-C_{-5} zeigte eine Aktivität von 15.000 cpm/Min.

3d) Isolierung des Pentanucleotids C-A-C-C-A

$tRNA^{Phe}$-C-C-A wurde mit 0.25 % [^{3}H]-markierter $tRNA^{Phe}$ versetzt und mit T_1-Ribonuclease gespalten. Die Isolierung des 3'-terminalen Pentanucleotids von anderen Spaltprodukten der $tRNA^{Phe}$ erfolgte durch Chromatographie bei pH 3.5 an DE-Cellulose. Das Pentanucleotid erhielt man im Durchbruchvolumen. Durch Rechromatographie dieser Fraktion bei pH 7.0 erreichte man die Abtrennung von co-chromatographierten Oligonucleotiden. Das Pentanucleotid wurde bei einer NaCl-Konzentration von 0.2 M eluiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. H.G. Zachau, Angew.Chem. 81 (1969) 645.

R.W. Holley, J. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison, M. Marquisee, S.H. Merril, J.R. Penswick und A. Zamir, Science 147 (1965) 1462.

2. S.H. Kim, G. Quigley, F.L. Suddath, A. McPherson, D. Sneden, J.J. Kim, J. Weinzierl, P. Blattmann und A. Rich, Proc.Natl.Acad.Sci. 69 (1972) 3746. Nature 248 (1974) 2o.

3. D. Richter, V. Erdmann und M. Sprinzl, Nature N.B. 246 (1973) 132.

4. M. Sprinzl, F. Cramer, Nature N.B. 245 (1973) 3.

5. F. Chapeville, F. Lippmann, G. v.Ehrenstein, B. Weisblum, J.J. Ray und S. Benzer, Proc.Natl.Acad.Sci. 48 (1962) 1o86.

H.G. Knorana, H. Büchi, H. Ghosh, W. Gupta, T.M. Jacob, H. Kössel, R. Margan, S.A. Narang, E. Ohtsuka, R.D. Wells, Cold Srping Harbor Symp. 31 (1966) 39.

6. R. Stern, L.E. Zutra, U.Z. Littauer, Biochemistry 8 (1969) 313.

7. F. von der Haar, E. Schlimme, M. Gomez-Guillen und F. Cramer, Eur.J. Biochem. 24 (1971) 296.

8. F. Cramer, Progr.Nucleic Acid Res. 11 (1971) 489.

9. S.H. Kim, G. Quigley, F.L. Suddath, A. Rich, Proc.Natl.Acad.Sci. 68 (1971) 841.

1o. F. Cramer, V.A. Erdmann, F. von der Haar und E. Schlimme, J.Cell.Physiol. 74 (1969) 163.

R.E. Streeck, H.G. Zachau, Eur.J.Biochem. 3o (1972) 382.

11. U.L. RajBhandary, A. Stuart, S.H. Chang, J.Biol.Chem. 243 (1968) 584.

12. A.A. Baev, T.V. Venkstern, A.D. Mirzabekov, A.J. Krutilina, L. Li, V.D. Aksel'rod, Mol.Biol. (russ.) 1 (1967) 754.

M. Yaniv, B.G. Barrel, Nature 222 (1969) 278.

13. M. Grunberg-Manago, P.J. Ortiz, S. Ochoa, Biochem.Biophys.Acta 2o (1956) 269.

14. Cl.B. Klee, J.Biol.Chem. 244 (1969) 2558.
S.P. Fitt, E.A. Fitt, Biochem.J. 1o5 (1967) 25.

15. H. Schetters, Dissertation, Universität Göttingen, 1971.

16. F.A. Neelon, M. Molinaro, H. Ishikura, L.B. Steiner und G.L. Cantoni, J.Biol.Chem. 242 (1967) 4515.

17. D. Pörschke, Biopolymers 1o (1971) 1989.

18. S. Frederiksen, H. Klenow, Biochem.Biophys.Res.Commun. 29 (1967) 758.
S. Frederiksen, H. Klenow, Cancer Res. 22 (1962) 125.

19. F. Cramer, H. Seidel, Biochim.Biophys.Acta 72 (1963)157.

2o. F. Cramer, H. Seidel, Z.Naturforschg. 186 (1973) 164.

21. H. Seidel, Dissertation, T.H. Darmstadt, 1962.

22. F. Cramer, H. Seidel, Biochim.Biophys.Acta 91 (1964) 14.

23. M. Sprinzl, F. von der Haar, E. Schlimme, H. Sternbach, F. Cramer, Eur.J.Biochem. 25 (1972) 262.

24. F. von der Haar, E. Schlimme, V.A. Erdmann, F. Cramer, Bioorganic Chemistry 1 (1971) 282.

25. J.D. Smith, Methods in Enzymology Vol. XII (1967) 35O.

26. R.F. Steiner, R.F. Beers, Polynucleotides, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1961, S. 25.

27. M.A. Stevens, D.J. Morgrath, H.W. Smith, G.B. Brown, J.Amer.Chem.Soc. 8o (1958) 2755.

28. F. Fittler, Dissertation T.H. Darmstadt, 1964.

29. F.H. Martin, O.C. Uhlenbeck, P. Doty, J.Mol.Biol. 57 (1971) 2o1.

3o. J. Ravetch, J. Gralla, D.M. Crothers, Nucleic Acid Research 1 (1974) 1o9.

31. J. Tinoco, P.N. Borer, B. Dengler, M.D. Levine, O.C. Uhlenbeck, D.M. Crothers, J. Gralla, Nature 246 (1973) 4o.

32. W. Bujer, D. Pörschke, J.Mo.Biol. 72 (1972) 123.

33. J.R. Fresco, A. Adams, R. Ambrose, P. Barbey, T. Brenner, Cold Spring Harbor Symposium 31 (1966) 527.

34. F. Cramer, H. Doepner, F. von der Haar, E. Grallath, E. Gundel, Proc.Natl. Acad.Sci. 61 (1968) 1384.

35. S.R. Holbrook, K.L. Wong, S.R. Kearsey, E.R. Reid, R.C. Dickerson, J.Mol.Biol. 72 (1973) 71.

36. M. Sprinzl, unveröffentlichte Ergebnisse.

37. R.W. Chambers, Progress in Nucleic Acid Res. 11 (1971) 489.

38. E.K. Dube, Nature N.B. 243 (1973) 103.

39. R. Sternbach, F. von der Haar, E. Grallath, E. Gärtner, F. Cramer, Eur. J.Biochem. 22 (1971) 166.

40. F. von der Haar, Eur.J.Biochem. 34 (1973) 84.

41. L. Bosch, P. Wolfert, F. von der Haar, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 353 (1972) 1330.

42. R. Wolfert, Staatsexamensarbeit, 1972, Göttingen.

43. A. Maelicke, F. von der Haar, F. Cramer, Biopolymers 12 (1973) 27.

44. A. Maelicke, A. Maczenko, G. Engel, in Vorbereitung.

45. E.G. Payne, J.Org.Chem. 24 (1959) 1354.

46. E.A. Schäfer, Dissertation, TH Braunschweig, 1967.

47. M. Uziel, C. Koh, W.E. Cohn, Anal.Biochem. 25 (1968) 77.
H.G. Gassen, W. Leifer, Z.Anal.Chem. 252 (1970) 337.

48. E. Grallath, F. von der Haar, F. Cramer, Naturwissenschaften 56 (1969) 631.

49. R. Sternbach, in Vorbereitung.

50. A.A. Bonner, P.M. Pedersen, Klemola und Meinander-Bauer, Verlag Chemie, Weinheim, 1964.

LEBENSLAUF

Name:	Rüdiger Solfert
Geburtsdatum:	28.9.1939
Geburtsort:	Gleiwitz/Oberschlesien
Eltern:	Wilhelm Solfert, kaufm. Angestellter Charlotte Solfert, geb. Wilpert

-.-.-.-.-.-

1946-1952	Volksschule Bremen-Aumund
1952-1956	Oberschule Bremen-Vegesack
1956	Zeugnis der mittleren Reife
1956-1957	Praktikant im chem. Labor Dr. Melzer, Bremen
1958-1960	Chemieschule Dr. Allardt, München, Ausbildung zum Chemotechniker
1960	Abschlußprüfung
1960-1962	Berufstätigkeit als Chemotechniker in der I. Medizinischen Klinik, München
1962-1966	Berufstätigkeit als Chemotechniker bei der chem. Industrie (Hormon-Chemie, München)
1966	Begabtenprüfung des Bayer. Ministeriums für Unterricht und Kultus
WS 1966 -SS 1968	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Universität München
SS 1968-1972	Studium der Chemie und Biologie an der Universität Göttingen
Dez. 1972	Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Chemie, Biologie und Pädagogik in Göttingen
1972-1974	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Cramer